

MINISTERIE VAN MIDDENSTAND EN LANDBOUW
Bestuur onderzoek en ontwikkeling
Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek Gent

RIJKSSTATION VOOR ZEEVISSERIJ - OOSTENDE
Directeur a.i.: Dr. Ir. W. Vyncke

De chemische identificering van vissoorten

W. Deschacht



MINISTERIE VAN MIDDENSTAND EN LANDBOUW
Bestuur onderzoek en ontwikkeling
Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek Gent

RIJKSSTATION VOOR ZEEVISSERIJ - OOSTENDE
Directeur a.i.: Dr. Ir. W. Vyncke

De chemische identificering van vissoorten

W. Deschacht



Inleiding.

Tot voor kort bestond er weinig of geen behoefte aan een niet-biologische methode voor het identificeren van een vissoort. Vis, in het bijzonder zeevis, werd aangeland, verhandeld en gekonsumeerd op grond van de beschikbare uitwendige kenmerken. In de lange keten van vangst tot verbruik vergde het maar weinig moeite om zich de kennis eigen te maken die vereist was om er zich van te vergewissen dat het geleverde produkt met de gevraagde waar overeenstemde. Voor de enkele keer dat dit niet mogelijk bleek en het toch nodig was een naam toe te wijzen aan een bepaald produkt, werd gebruik gemaakt van ingenieuze methodes. Zo kan een microscopisch onderzoek van de nog aanwezige schubben uitsluitsel geven over de soort ingeblikte zalm (R. Newton, 1979), of kan aan de hand van de lichtreflectie een vervalsing van krab met kabeljauw worden ontdekt (C. C. Freeman, 1968).

Enerzijds onder de druk van de gewijzigde voedingsgewoonten van de consument en anderzijds als een gevolg van de evoluerende economische toestand in de visverwerkingssector groeide de behoefte aan een techniek die het mogelijk moet maken een vissoort te identificeren zonder beroep te doen op de morfologische kenmerken. Meer en meer drukt de consument de wens uit voor panklare, zelfs hapklare produkten. In het bijzonder om de salubriteit en de beschikbaarheid van het produkt te kunnen waarborgen, bouwde de sector een koude keten uit langsheen het geheel van de bewerkings- en verdelingskanalen. Dergelijke investeringen noopten het bedrijfsleven tot het drukken van de kosten, en één benaderingsweg bestond en bestaat er in om zo weinig mogelijk ballast in de koude keten mee te zeulen. Eén gevolg hiervan is dat gedurende het bewerken en het eventueel klaarmaken van de voorbereide porties de gemakkelijk te herkennen biologische karakteristieken verloren gaan. De enige informatie waarover de consument nog beschikt zijn de enkele, niet controleerbare gegevens die op de verpakking voorkomen. Deze niet erg bevredigende situatie leidt gemakkelijk tot wantrouwen en tot het afkalven van de markt.

Wanneer de marktsituatie wijzigingen ondergaat, spelen de bedrijven hierop in. Dit leidt dan vaak tot bijkomende investeringen. Om de gestegen kosten te ondervangen kan een schaalvergroting van de onderneming uitkomst brengen. Dit betekent meteen een stijgende vraag voor de beschikbare grondstoffen en het op de lokale markt meer in het gedrang komen van de bevoorrading van de consument. Voor het bedrijf houdt dit ook de strijd in voor een groter marktaandeel. In deze concurrentieslag worden niet zelden marketingmix strategieën aangewend die het met de eerlijkheid niet nauw nemen. Dit wordt dan weer in de hand gewerkt door de Babylonische verwarring die er in de dagelijkse praktijk van de vishandel op het vlak van de naamgeving bestaat. Verder verplicht de relatief geringe aanvoer in de lokale vismijnen de groeiende bedrijven om zich meer en meer op afgelegen markten te bevoorraden. Hierdoor worden belangrijke fasen van deze operatie onttrokken aan de directe controle van het bedrijf. Door de eisen inzake de kwaliteit en om de transportkosten zoveel mogelijk te drukken wordt op de plaats van aankoop, soms zelfs reeds aan boord van de vaartuigen, overgegaan tot het diepvriezen van partieel voor verdere

bewerking bedrijfsklaar gemaakte vis. Zowel de vishandel als het verwerkingsbedrijf worden in sterke mate van de goede trouw van de leverancier afhankelijk. In het bijzonder voor de verwerkingssector komt hier nog bij dat labels en verpakkingen gedurende het transport en het bewaren kunnen beschadigd worden zodat op het ogenblik van de bewerking vragen kunnen rijzen in verband met de aard van de grondstof.

Een algemeen principe.

De ontwikkeling van een niet-biologische identificatietechniek werd opgezet met de uiteindelijke bedoeling de uitvoering ervan ook in de bedrijven te laten doorgaan. Binnen de Vlaamse context betreft het hier laboratoria die in kleinere KMO's ingeplant zijn en meestal noch over een uitgebreide staf noch over veel technologisch geavanceerd materieel beschikken. Van meet af aan werd de ontwikkeling derhalve gekonfronteerd met diverse keuzen die tot een methode moesten leiden die:

- zo eenvoudig mogelijk was voor wat het hanteren van het materiaal betreft;
- zo goedkoop mogelijk was voor wat het gebruikte materiaal betrof;
- goed reproduceerbare resultaten opleverde;
- een gemakkelijke en vlot verlopende interpretatie van de gegevens toeliet;
- vrij was van het aanhouden van ruime voorraden aan uiteenlopende chemicaliën.

Het ligt voor de hand dat het hanteren van deze voorkeuren noodgedwongen tot enkele compromissen aanleiding geeft. Op de keper beschouwd dient rekening gehouden te worden met twee belangrijke toepassingsgebieden.

De "enge" benadering is het gevolg van het feit dat ieder afzonderlijk bedrijf slechts in een beperkt gamma soorten geïnteresseerd is. De verschillende bedrijven moeten niet in dezelfde soorten geïnteresseerd zijn en indien het "dezelfde" soorten zijn, kan de bevoorrading vanuit verschillende geografische gebieden gebeuren zodat "geografische" variëteiten tot de mogelijkheden behoren. Deze kunnen tot identificatieproblemen leiden, maar die zullen dan eerder tussen verschillende productiecentra optreden dan wel binnen een gegeven vestiging. Daar ieder bedrijf haar assortiment aan de consument aanbiedt, vereist de bescherming van deze laatste een methode die een ruimere scala soorten, en indien nodig, variëteiten, bestrijkt.

De basistechniek.

Indien rekening gehouden wordt met de volgende feiten:

- een soort kan beschouwd worden als een "geïsoleerde" verzameling van genen;
- eiwitten vormen de "vertaling" van genen;
- de mogelijkheden groot zijn om met behulp van de elektroforese een visueel beeld van de aanwezige, oplosbare eiwitten te bekomen;

dan ligt het voor de hand om door middel van een elektroforese methode het voorop gezette doel te bereiken. Daar met het oog op een eventuele transfer van de techniek naar het bedrijf een eenvoudige werkwijze de voorkeur verdiende, werd het onderzoek gestart met een

electroforese op celluloseacetaatbandjes. Vervolgens werden de mogelijkheden van de disc-electroforese onderzocht om uiteindelijk te belanden bij het iso-electrofocuseren.

Het werk van D. C. H. Baars en A. Ruiter is vermoedelijk een van de eerste pogingen om voor de identificering van visspecies een zone-electroforese op zetmeelblokken aan te wenden. Dit onderzoek bracht een geringe reproduceerbaarheid aan het licht, zodat een identificatie slechts mogelijk geacht werd indien terzelfdertijd een analyse op een referentie gebeurde. Daartoe werden een tweetal mogelijkheden uitgetest en het bewaren van stalen in diepvries bleek veruit de beste resultaten op te leveren. Een dergelijke benadering kan uiteraard succesvol toegepast worden wanneer het onderzoek beperkt is tot een klein aantal soorten, met andere woorden wanneer het resultaat gezocht kan worden in een beperkte gamma van mogelijkheden. maar wordt al snel onbruikbaar bij een toenemend aantal mogelijke keuzen. Aan het bewaren en het naderhand raadplegen van de opgeslagen electroferogrammen van "referentievissen" zal derhalve aandacht moeten besteed worden.

De celluloseacetaatstrip.

De voordelen.

Het ligt niet in de bedoeling hier de gevolgde werkwijze uitvoerig toe te lichten. Er kan worden aangestipt dat de electroforese op celluloseacetaatbandjes talrijke voordelen biedt, onder meer:

- een zeer geringe absorptie door de drager;
- het homogeen zijn van de drager;
- de relatieve zuiverheid van de drager;
- de geringe tijdsduur voor een analyse;
- de geringe hoeveelheid staal;
- het gemakkelijk transparant maken van de bandjes;
- de eenvoudige apparatuur;
- de eenvoudige techniek;
- de relatief lage prijs van eventuele registratieapparatuur;
- het gemakkelijk bewaren van de bandjes.

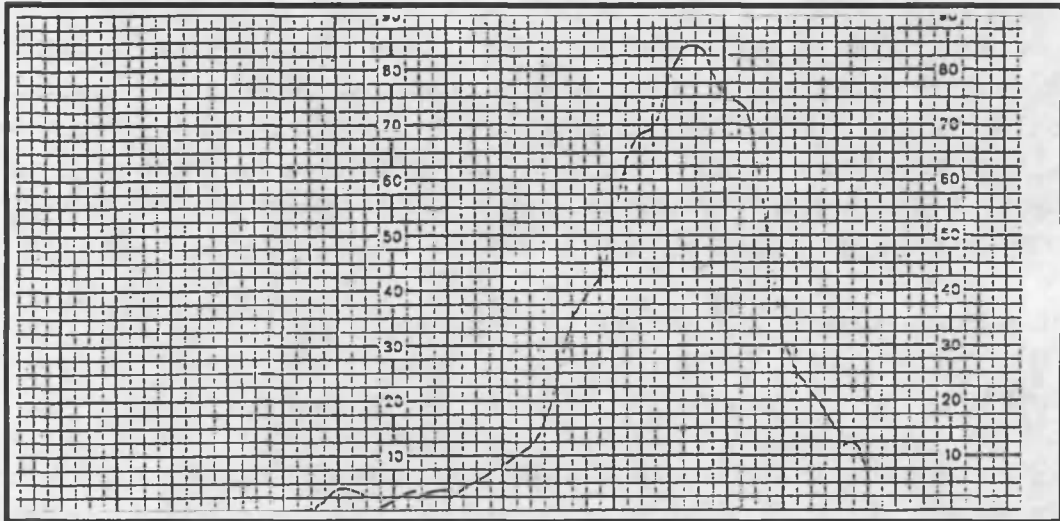
De werkwijze.

De werkwijze kan als volgt worden samengevat:

- bereiden van het staal (cf. lager);
- weken van het bandje;
- de tank vullen met buffer;
- aanbrengen van het staal op zowat 1,5 cm van de kathode;
- plaatsen van het bandje in de tank;
- aanbrengen van de electrodes;
- spanning regelen op 300 volt;
- stroom inschakelen voor 90 minuten;
- strip kleuren met Ponceau S;
- ontkleuren van de achtergrond;

- eventueel transparant maken van de strip en scannen;
- de strip drogen en bewaren.

Figuur 1. Schelvis
Optische dichtheid op celluloseacetaat



De resultaten.

De resultaten zijn helaas niet bijster goed. In figuur 1 is het patroon van een schelvis, *Gadus aeglefinus* L., weergegeven. Naast de geringe reproduceerbaarheid blijkt het electroferogram slechts weinige, slecht gescheiden banden te bezitten. Deze vaststellingen zijn in overeenstemming met vroegere onderzoekingen van R. J. Learson (1969, 1970).

Disc-electroforese.

Deze techniek is heel wat complexer dan de electroforese op celluloseacetaatbandjes. De electroforese werd uitgevoerd op een kolom van een poly-acrylamide gel (PAG).

De voordelen.

Deze werkwijze beschikt over de volgende troeven:

- de PAG zijn transparant;
- ze zijn steviger dan zetmeelgels;
- de gemiddelde poriëngrootte kan enigszins worden beïnvloed;
- de hoogste grens van de poriëngrootte kan enigszins worden beïnvloed;
- het gel vertoont slechts een geringe absorptie;
- een ruime gamma buffers kan worden gebruikt;
- de gels kunnen bewaard worden;
- de apparatuur kost weinig;
- de lage prijs van de eventuele registratieapparatuur;

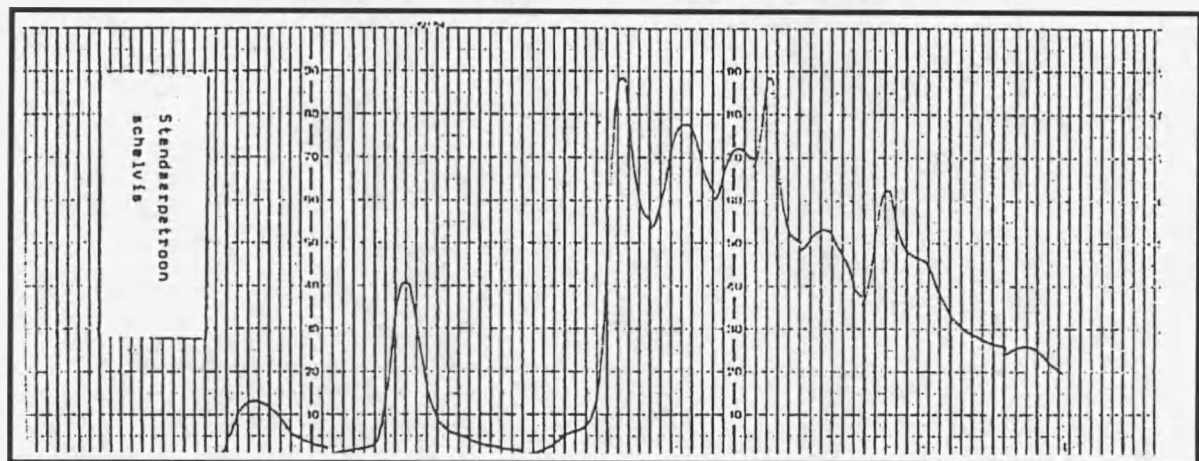
- de opsplitsing in banden is beduidend beter dan bij de vorige techniek.

De werkwijze.

In een notendop samengevat komt de modus operandi hierop neer:

- het extraheren van de eiwitten (cf. lager);
- het opmaken van het reactiemengsel;
- opvullen van de electroforesebuisjes;
- polymeriseren;
- opstellen van electroforeseapparaat;
- aanbrengen van het staal;
- vullen van de buffertank;
- koelen van de buffer;
- de electroforese: 45 minuten bij 200 volt;
15 minuten bij 250 volt;
- het gel losmaken;
- het gel uit het buisje halen;
- fixeren en kleuren van het gel met Amido Black 10B;
- ontkleuren van de achtergrond;
- het eventueel scannen;
- het bewaren van het gel.

Figuur 2. Schelvis
Optische dichtheid disc-electroforese



Het resultaat.

De beduidend betere opsplitsing van het electroferogram in banden blijkt uit figuur 2. Ook in dit onderzoek werd gebruik gemaakt van een schelvisextract.

De nadelen.

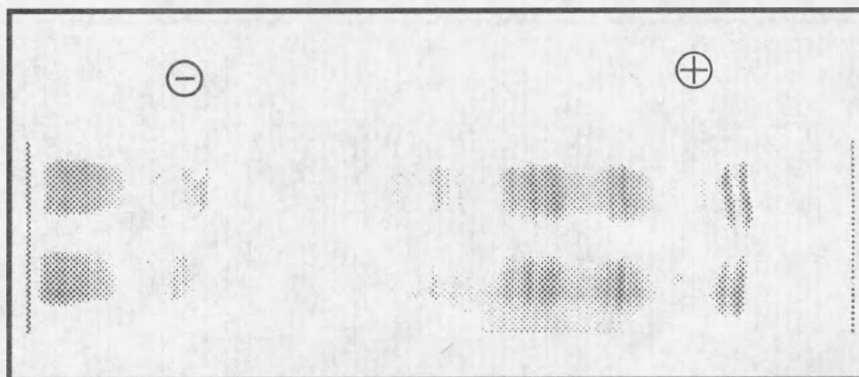
Dit betere resultaat weegt echter niet op tegen het grote aantal, kleinere en grotere nadelen die aan deze techniek blijken te kleven. Zo kan verwezen worden naar onder meer:

- een (klein) gezondheidsrisico bij het manipuleren van het PAG;
- het te polymeriseren mengsel wordt opgemaakt met behulp van 4 oplossingen;
- deze oplossingen MOETEN aangemaakt worden met DUBBEL gedistilleerd water;
- deze oplossingen MOETEN voor gebruik ontgast worden ;
- de hoge eisen inzake zuiverheid van de polymerisatiebuisjes;
- de vereiste handigheid voor het losmaken van de gels uit de buisjes;
- de geringe reproduceerbaarheid van de ligging van de banden;
- de mogelijke, maar niet eenvoudige bewaring van de gels, noopt tot het inschakelen van een scanner.

Uit de vergelijking van figuur 2 aan de figuur 1 blijkt duidelijk dat de disc-electroforese een groter aantal, zij het niet altijd evengoed gescheiden banden, oplevert. R. R. Thompson (1967) meende dat electroferogrammen die bekomen werden met dergelijke methode voor een absolute identificatie niet bruikbaar zijn, maar uitstekende diensten bij vergelijkingsexperimenten kunnen bewijzen. R. J. Coduri et al. (1979) gebruikten een analoge techniek om zalm van forel te onderscheiden.

Iso-electrofocusing.

Figuur 3. Schelvis.
IEF opname op PAG



Onder de verschillende benaderingen waarbij gebruik gemaakt wordt van een electroforese techniek, zijn de iso-electrofocusing (IEF) methodes ongetwijfeld diegene die de beste resultaten opleveren. Daarbij is gebruik gemaakt geworden van poly-acrylamide (PAG) gels onder meer in de onderzoeken van R. C. Lundstrom et al (1979), R. C. Lundstrom (1980, 1981, 1983) en D. Führling en C. Gersonde (1980) en van AGAROSE gels bij deze van R. C. Lundstrom (1981), R. C. Lundstrom et al (1983) en W. D. Hamilton (1982). Beide dragers bleken voordelen te hebben. In wat volgt worden deze werkwijzen met de term "klassiek" aangeduid en dit in tegenstelling tot het door LKB ontwikkelde, en ook later nog te behandelen, PhastSystem waarbij kleine PAG gels gebezigd worden. Alleen ter illustratie

wordt hier een afbeelding van een IEF opname van Schelvis in figuur 3 gegeven. Het is duidelijk dat meerdere, onderling goed gescheiden banden voorliggen en deze benadering mogelijkheden inhoudt om tot de chemische identificatie van een species te komen.

De extractie.

Ook al verschillen de technieken, een aantal zaken zijn aan ieder of aan meerdere onder hen gemeenschappelijk. Dit geldt ondermeer voor de extractie van de eiwitten.

Onderzoekingsmateriaal.

Zo nodig werd het materiaal in diepgevroren toestand bewaard. Er werden experimenten uitgevoerd met het materiaal in drie verschillende toestanden, met name:

- vers visvlees;
- visvlees dat aan een zachte thermische behandeling onderworpen geweest was, b.v. gerookt materiaal of gedeeltelijk behandelde produkten zoals fishsticks;
- gekookt visvlees.

De meeste experimenten hadden betrekking op vers visvlees. De vis was herkomstig uit experimentele visserijen die door de biologen van het Rijksstation voor Zeevisserij werden ondernomen of werd via de normale handelskanalen bekomen. In dit laatste geval was het omwille van de onzekere geografische herkomst niet altijd mogelijk om een "biologische" identificatie aan de waarnemingen te verbinden.

Voorbereiden van het staal.

Materiaal.

- tetrachloorkoolstof (Merck p.a. 2222);
- 1 % glycine (Merck p.a. 4201) in gedistilleerd water;
- kleine plooifilters (S&S 595 1/2);
- Waring Blendor;
- vleesmolen;
- kleine centrifuge (diameter 9 cm);
- mortier en stamper;
- zeezand (Merck p.a. 7712);
- dialyse membraan (Visking);
- glasparsels.

Werkwijze.

Na het eventueel ontdooien, en het eventueel koken, werd de vis ontgraat. Het vlees werd vervolgens in de vleesmolen gemalen en via de klassieke techniek werd de omvang van het staal gereduceerd en gehomogeniseerd. Uiteindelijk werden ongeveer 25 g visvlees in een mortier vermengd met 25 ml tetrachloorkoolstof. Dit mengsel werd herhaaldelijk omroerd en na 30 minuten werd de tetrachloorkoolstof afgegoten. Het visvlees werd in een beker van een

Warring Blendor gebracht, er werden 15 ml glycineoplossing toegevoegd en het geheel werd gedurende 15 seconden op lage snelheid gemixt. De inhoud van de beker werd overgebracht in een centrifugebuis en er werd 10 minuten bij 15.000 toeren/minuut gecentrifugeerd. Deze operatie was niet kritisch. Ze vergemakkelijkte de scheiding van het extract en de weefselresten. De vloeistof werd door een plooifilter gegoten. Het filtraat werd in de ijskast bewaard tot de volgende dag.

Het is mogelijk dat de beschikbare hoeveelheid visvlees te gering is om de hierboven geschetste werkwijze te volgen. In zo'n geval kan men

- ofwel van de diverse vloeistoffen volumes gebruiken aangepast aan de hoeveelheid visvlees;
- ofwel de mixer niet gebruiken maar het visvlees in de mortier met een weinig glycineoplossing mengen en, zo nodig na het toevoegen van een weinig zeezand, met behulp van de stamper pletten. Er wordt daarna niet gecentrifugeerd.

De geschetste werkwijze leidt meestal tot een bruikbaar extract. Hierna citeren we de belangrijkste problemen die zich in de loop van de experimenten voordeden. Ze zijn ten getale van drie, met name: een gelvorming van het extract, een zeer geringe hoeveelheid filtraat en een deformatie van de banden tijdens de elektroforese.

DE GELVORMING.

Tabel 1. Gelvorming gedurende de extractie.

Soort	Toestand visvlees
Hondshaai	rauw / gekookt
Inktvis	gekookt
Victoriabaars	gekookt
Zalm	gerookt / gekookt
Zandhaai	gekookt

De gelvorming van het extract was de meest frequent voorkomende moeilijkheid. Een overzicht van de species, waarbij dit fenomeen werd waargenomen, werd in tabel 1 gegeven. In de loop van het onderzoek werden drie verschillende werkwijzen uitgetest voor de aanpak van dit probleem. In een eerste methode werden aan het extract glazen parels toegevoegd en het geheel werd mechanisch geschud voor meerdere uren, zo nodig voor de gehele nacht. In een tweede benadering werd gebruik gemaakt van stukjes visvlees die op het gel, eventueel op een staalhouder werden geplaatst. Alleen de eerste werkwijze leidde tot een aanvaardbaar resultaat. De laatst genoemde techniek leidde vrijwel altijd tot een sterke deformatie van de

banden in het electroferogram. In een derde werkwijze werd een stukje van het gestolde extract op de elektroforesematrix geplaatst. Na een eerste 15 minuten werd dan zo goed als mogelijk het stukje gel verwijderd. Deze techniek werd vrij veel gebruikt bij het onderzoek van gekookte vis. Het is een eenvoudige werkwijze en ofschoon een deformatie van de banden niet is uitgesloten, werden meestal goede resultaten bekomen. Het is duidelijk dat deze benadering niet toelaat om in het electroferogram een interval aan belastingen in te bouwen (cf. lager). Of men veel te veel, veel te weinig of een gepaste hoeveelheid staal gebruikte wordt pas duidelijk na de kleuring.

DE HOEVEELHEID FILTRAAT.

In enkele onderzoeken bleek het filtreren zeer moeilijk te verlopen. Dit leidde tot zeer lange wachttijden, en in enkele gevallen ook tot een zeer geringe hoeveelheid filtraat. In dit laatste geval werd niet gecentrifugeerd.

EEN STERKE DEFORMATIE VAN DE BANDEN.

Toen ondanks alle zorgen bij het onderzoek van enkele species toch weer telkens electroferogrammen met sterk gedeformeerde banden bekomen werden, werden deze filtraten nog aan een eenvoudige dialyse onderworpen. Zo'n filtraat werd een Visking zakje gegoten en dit werd in een beker met gedistilleerd water ondergedompeld voor 24 h. Deze soorten werden in tabel 2 opgesomd.

Tabel 2. Species waarbij een dialyse van het extract vereist was.

Gladde rog
Doornrog
Stekelrog

De klassieke IEF benadering.

Ondanks het feit dat de beide matrixen uit de "klassieke" benadering elk een eigen modus operandi hebben, zijn er een aantal gemeenschappelijke elementen voorhanden.

De modus operandi.

Reagentia en apparatuur.

DE REAGENTIA.

- 1 M ortho-fosforzuur (Merck p.a. 573) in gedistilleerd water;
- 1 M natriumhydroxide (Merck p.a. 9956) in gedistilleerd water;

- bewaaroplossing: 100 ml glycerine (Merck p.a. 4094) + 1.000 ml gedistilleerd water ;
- fixeeroplossing:
 - 57,5 g trichloorazijnzuur (Merck 807),
 - 17,25 g sulfosalicylzuur (Merck p.a. 691),
 - oplossen in 500 ml gedistilleerd water;
- ontkleuringsoplossing:
 - 500 ml ethanol (Merck p.a. 983),
 - 160 ml ijsazijn (Merck p.a. 61),
 - oplossen in en aanlengen met gedistilleerd water tot 2.000 ml;
- kleuringsoplossing:
 - 0,460 g Coomassie Brilliant Blue R250 (Merck 12553) oplossen in 400 ml ontkleuringsmiddel en door plooifilter (S&S 595 1/2) gieten;
- bufferoplossing pH 4,0:
 - een zakje Philips pH4P/500 overbrengen in een maatkolf van 100,0 ml, oplossen in en aanlengen met gedistilleerd water tot de merkstreep;
- bufferoplossing pH 9,0:
 - een zakje Philips pH9P/500 overbrengen in een maatkolf van 100,0 ml, oplossen in en aanlengen met gedistilleerd water tot de merkstreep;
- white spirit (BDH 15059).

ELECTROFORESEAPPARAAT.

De LKB multiphor werd gebruikt voor alle "klassieke" experimenten. Het toestel werd geregeld op:

- een hoogste spanning van 1.400 volt;
- een hoogste stroomsterkte van 20 mA;
- een stabiel maar begrensd vermogen van 10 watt.

Aan te stippen valt dat deze instelling gold voor een 1/2 vel van het door LKB gebruiksklaar geleverde PAG gel en voor een op maat gesneden velletje AGAROSE gel (FMC). Op het gel wordt later uitvoeriger ingegaan.

KOELING.

Het koelwater werd door middel van een Colora dompelcryostaat op een temperatuur van ongeveer 5 °C gebracht. De watervoorraad was opgeslagen in een klassiek waterbad. Met behulp van een kleine circulatiepomp werd het naar de koelplaat in het multiphor apparaat gestuurd om vervolgens als mantelvloeistof via een dubbelwandige titratiebeker opnieuw het waterbad te bereiken. In de titratiecel was water voorhanden waarvan de temperatuur gemeten werd. Deze waarde werd geacht de temperatuur te zijn van het koelwater op het ogenblik waarop dit de koelplaat van het elektroforesetoestel verliet en werd beschouwd als de temperatuur waarbij de elektroforese doorging.

BIJKOMENDE GEMEENSCHAPPELIJKE BENODIGDHEDEN

- electrodebandjes (LKB 1850-911);
- kleine stukjes absorberend papier voor het aanbrengen van het staal (LKB 80-1129-46);
- dik absorberend papier (BioRad 165-0921);
- gewoon absorberend papier;
- ontkleurbad (BioRad 556);
- pH meter (Philips PW9422);
- aangepaste electrode voor het meten van de pH op het gel (Philips C520-8 BNL);
- micropipet(ten) met aangepaste tip;
- een PC;
- een scanner (CHINON 3000).

De elektroforese.

Een gelijkmatige film white spirit werd op de koelplaat aangebracht. Hierop werd het gel geplaatst er zorg voor dragend dat geen luchtbelllen het thermische contact tussen het gel en de koelplaat verminderen. Om de positie van het gel doorheen de experimenten te kunnen handhaven, werd gebruik gemaakt van de dwarse kruisdraden die voorkomen op een op de plaat gelegde mal. De electrodebandjes werden op maat gesneden en goed met de electrodevloeistof bevochtigd. Voor de kathode werd gebruik gemaakt van de 1 molaire oplossing van ortho-fosforzuur en voor de anode van de 1 molaire natriumhydroxyde oplossing. De overmaat vloeistof werd door betten met absorberend papier weggenomen. De strips werden op het gel geplaatst en door een gelijkmatig aandrukken werd een goed contact tussen beide bekomen. Vervolgens werden op zowat 1,5 cm afstand van de kathode kleine stukjes absorberend papier gelegd. Door de aanwezigheid van een raster op de koelplaat werd het "reproduceerbaar" plaatsen van deze "staalhouders" vergemakkelijkt. De circulatie van het koelwater werd op gang gebracht, op elk stukje papier werd een hoeveelheid staal aangebracht, het deksel werd gesloten en de elektroforese werd gestart. Na 15 minuten werd de stroom onderbroken, de staalhouders werden weggenomen en de stroom werd opnieuw ingeschakeld voor een periode van 90 minuten. Het deksel werd geopend en de pH waarde van het gel werd bepaald. Deze meting gebeurde om de cm en de meetrichting, van kathode naar anode of andersom, werd door het lot bepaald. Na het uitvoeren van de pH metingen werd de elektroforese opnieuw op gang gebracht voor 15 minuten. Hierdoor werden de gevolgen van de diffusie, het resultaat van de tijdrovende pH metingen, ongedaan gemaakt.

De pH-bepaling.

Deze meting was zeer tijdrovend en kan onder bedrijfsomstandigheden achterwege blijven. Hier werd ze uitgevoerd om eventueel abnormaal reagerende gels op het spoor te komen. De gekombineerde electrode werd in contact gebracht met de oppervlakte van het gel. De temperatuur werd gemeten zoals hierboven aangegeven en op de pH-meter ingesteld en de pH waarde werd afgelezen. De meetpunten werden gesitueerd zowat halverwege de hoogte van het gel en op de snijpunten van de overlangse met de horizontale kruisdraden van de mal.

De documentatie.

In principe kan een identificatie gebeuren door in ieder IEF experiment een goed gekozen referentie te betrekken. Deze werkwijze heeft evenwel een beperkte toepasbaarheid, alleen reeds omwille van het niet altijd beschikbaar zijn van het geschikte referentiemateriaal. Twee wegen werden gevolgd om een bekomen electroferogram in de toekomst te kunnen gebruiken als vergelijkingsmateriaal.

BEWAREN EXPERIMENTELE MATERIAAL.

Deze operatie is afhankelijk van de gebruikte matrix en wordt ten gepaste tijde behandeld.

GEDIGITALISEERDE AFBEELDING.

Het gedroogde gel werd op de basisplaat van de scanner geplaatst en via een aangepaste software werd het electroferogram ingelezen. Het digitaliseren gebeurde in zwart-wit en er konden slechts 16 grijsschakeringen onderscheiden worden. De resultaten werden opgeslagen in het PCX formaat. Al de afbeeldingen van electroferogrammen die bekomen werden met de klassieke IEF methode, zijn op deze wijze gerealiseerd geworden. De positionering van het gel op de basisplaat van de scanner gebeurde met behulp van hetzelfde model dat op het electroforeseapparaat werd gebruikt.

PA-gels.

BIJZONDERE REAGENTIA EN APPARATUUR.

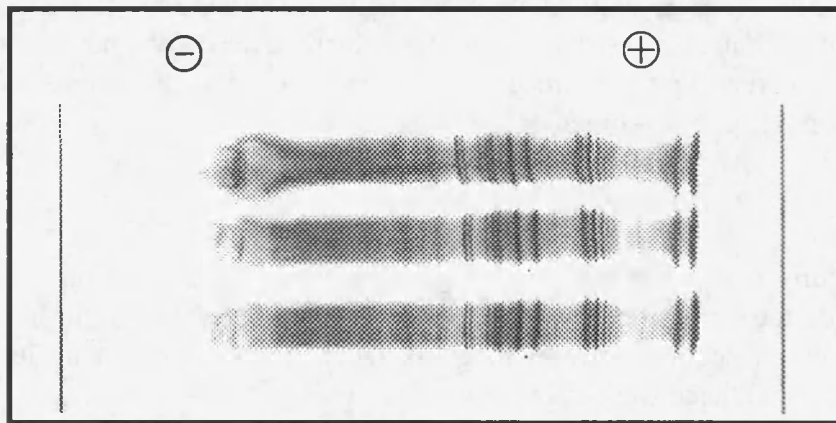
- gebruiksklare gel (LKB 80-1124-90);
- Mylar (LKB 1850-231);
- cellofaanfilm (BioRad 165-0922);
- calciumchloride-hexahydraat (Merck 102072);
- silicagel (Merck 107735);
- zelfklevende folie;
- sluitbare diepvrieszakjes;
- gaswasflessen als droogtoren;
- vacuümpomp;
- geldroger (BioRad 443);
- dessicator.

WERKWIJZE.

De gels waren 1 mm dik. Bij het aanwenden van gebruiksklare lappen mocht een betere homogeniteit verwacht worden tussen de individuele gels van één lot, en ook tussen de opeenvolgende loten zullen de verschillen kleiner uitvallen, dan bij eigenhandig gemaakte gels. Dit werd afgeleid uit de noodzaak om bij de vervaardiging op het laboratorium kleine hoeveelheden, vaak sterk viskeuze vloeistoffen te moeten afmeten en samenvoegen. Overigens is het eigenhandig gieten van het gel onder bedrijfsomstandigheden moeilijk, waarschijnlijk zelfs niet mogelijk. Door de kant-en-klare gels aan te wenden, werden de experimenten als het ware binnen de "bedrijfscondities" geplaatst.

De gels hadden een pH interval van 3,5 tot 9,0. Het voorverpakte gel werd doormidden gesneden. Eén stuk werd van de verpakking ontdaan en in het experiment gebruikt, van het resterende deel werd de verpakking opnieuw verzegeld met kleeftape en dit werd voor later gebruik in de ijskast opgeslagen. Van het vloeibare staal werden 5, 10 en 20 microliter op de geplaatste staaldragers aangebracht. In latere proeven werden met gedistilleerd water van het extract verdunningen van 1/2 en 1/5 gemaakt en van het extract en de verdunningen werden 20 microliter gebruikt. Het resultaat van een experiment op kabeljauw werd in figuur 4 afgebeeld.

Figuur 4. electroferogram op PAG
Kabeljauw



Fixeren.

Het gel werd in het fixeerbade ondergedompeld voor een periode van 60 minuten.

Tussenbehandeling.

Het gel werd voor 30 minuten in de bewaaroplossing geplaatst.

Kleuren.

Een voldoende grote hoeveelheid van de kleuroplossing werd in een grote petrischaal (diameter 19 cm) gegoten en de gesloten schaal werd in een waterbad op 60 ° C geplaatst. Nadat de kleurvloeistof op temperatuur gekomen was, werd het gel hierin precies 10,0 minuten ondergedompeld. De temperatuur en de duur waren kritisch voor het bekomen van een goed resultaat.

Ontkleuren.

De kleuroplossing werd afgegoten en het gel werd voor 24 uur in het ontkleuringsapparaat geplaatst.

Tussenbehandeling.

Met het gel naar beneden werd het electroferogram voor de duur van 90 minuten in de bewaaroplossing ondergedompeld. Daarna werd het gel met de dragerzijde op een glasplaat gelegd en zo nodig gedurende de nacht in een ijskast bewaard.

Drogen.

Dit gebeurde in een droogapparaat onder vacuüm en bij 80 °C . Het proces duurde 90 minuten. In het apparaat werd eerst een stuk, dik en doornat , absorberend papier gelegd. Dit werd voorafgaandelijk van het aanklevende water ontdaan door betten met gewoon absorberend papier. Hierop werd het gel met de dragerzijde geplaatst. Het gel werd bedekt met een stuk natte cellofaan. Daarop kwam een tweede stuk nat absorberend papier. De bekomen "sandwich" werd gekeerd met het cellofaan naar onder. Het apparaat werd gesloten en het drogen nam een aanvang. Om de vacuümpomp enigszins te beschermen tegen allerhande vluchtige dampen werd de afgezogen lucht over twee met silicagel gevulde droogkolommen en vervolgens doorheen een koude trap (ijs + calciumchloride) geleid vooraleer in de pomp terecht te komen.

Bewaren.

Het langdurig bewaren van het gedroogde gel leverde problemen op. Het optredende vochtverlies leidde tot een krimpen van het gel en dat ging gepaard met het loslaten van de onderlaag. Om dit verschijnsel zoveel mogelijk tegen te gaan werden in de loop van dit onderzoek twee verschillende werkwijzen gebruikt.

De sandwich.

Aanvankelijk werd het gedroogde gel met de cellofaan tegen een stuk MYLAR geplaatst. De sandwich werd vervolledigd met een zelfklevende folie. Deze bedekte de geldrager en werd op dusdanige wijze aan de MYLAR laag vastgehecht dat de openingen langs de randen zo goed mogelijk afgesloten werden. Deze werkwijze bleek de krimp niet volledig te ondervangen.

Het diepvrieszakje.

Een andere, eenvoudiger, werkwijze berustte op het gebruik van een sluitbaar diepvrieszakje. Het gedroogde gel werd hierin geplaatst. en het zakje werd gesloten. Voor zoverre dit nu reeds kan beoordeeld worden leidde deze methode tot een veel trager voortschrijdende uitdroging en een geringere krimp.

Herstellen.

Aan te stippen valt dat een gedeeltelijk door krimp beschadigd gel vrij goed hersteld kon worden door het enkele uren in een met waterdamp verzadigde atmosfeer te plaatsen. Dit was gemakkelijk te realiseren met behulp van een excicator.

De voordelen.

Deze techniek biedt de volgende voordelen:

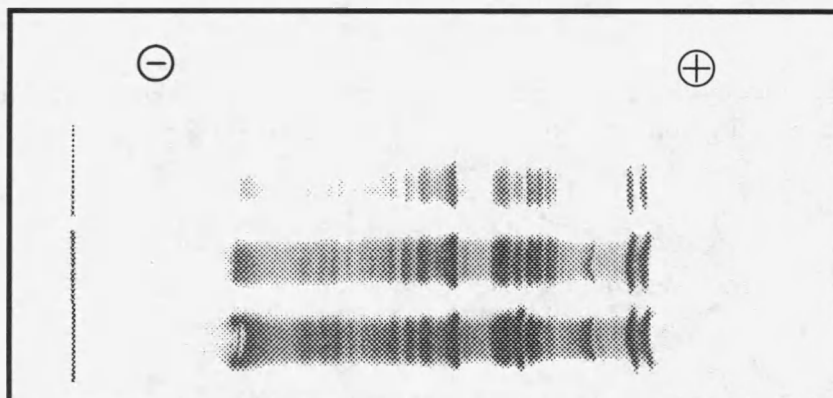
- transparante electroferogrammen;
- rijk met banden gestoffeerde electroferogrammen;
- de reproduceerbaarheid wordt weinig beïnvloed door de manipulaties, geringe verschillen in temperatuur of door verschillen in ervaring;
- de basisapparatuur is niet uitzonderlijk duur;
- men kan gebruiksklare gels in de handel verkrijgen;
- het is mogelijk om produkten te onderzoeken die aan een zachte thermische behandeling onderworpen werden.

Agarose gel.

BIJZONDERE REAGENTIA EN APPARATUUR.

- gebruiksklare gels (ISOGEL 56013 van FMC)
- dikke glasplaten
- droogstoof

Figuur 5. electroferogram op AGAROSE kabeljauw



WERKWIJZE.

Bij het onderzoek met de agarose gels werd gebruik gemaakt van de hierboven beschreven apparatuur en extracten. De gels hadden een dikte van 0,6 mm. zodat de hoeveelheid aan proteïnes die kon verwerkt worden lager was dan bij de PA-gels. Er werden dan ook 2,0, 5,0 en 10,0 microliter gebezigd. Later werden 10 microliter van het extract en van de 1/2 en 1/5 verdunningen gebruikt. Het pH interval strekte zich uit van 3,0 tot 10,0. Het resultaat van een onderzoek van kabeljauw werd afgebeeld in figuur 5.

Fixeren.

Het gel werd gedurende 10 minuten in de fixeervloeistof ondergedompeld.

Tussenhandeling.

Het electroferogram werd met water afgespoeld en met de dragerfilm op een aantal lagen absorberend papier geplaatst. Op het gel werd een met water doordrenkt stuk dik absorberend papier aangebracht. Achtereenvolgens werden hierop enkele lagen gewoon absorberend papier, een glasplaat en een totaal gewicht van ongeveer 2 kg gelegd. Na 10 minuten werd het electroferogram uit deze primitieve pers gehaald. De aangewende druk verdrijft de ampholieten uit het gel waardoor later het ontkleuren vlotter en gelijkmatiger verliep.

Wassen.

Het electroferogram werd voor 60 minuten in gedistilleerd water geplaatst. De recipiënt werd zo nu en dan heen en weer bewogen en het water werd om de 20 minuten verversd.

Drogen.

Het gel werd met de dragerzijde op een dikke glasplaat geplaatst. Het geheel werd in een droogstoof geplaatst bij 60 °C. Meestal was het gel volkomen droog binnen de 75 minuten.

Kleuren.

Het gedroogde electroferogram wordt met het gel naar onder in het kleurbad geschoven. De kleuring duurde 15 minuten bij kamertemperatuur.

Tussenhandeling.

Het gel werd met water afgespoeld.

Ontkleuren.

Bij het onderzoek van vers of aan een zachte thermische behandeling onderworpen materiaal werd het gel gedurende 2 h 30 in het ontkleuringsbad ondergedompeld. Bij de analyse van gekookt visvlees leverde deze werkwijze volkomen ontkleurde gels op. De behandelingsduur kon echter tot 30 minuten teruggebracht worden. Op dit ogenblik bleek het gel bij het onderzoek van gekookt visvlees nog informatie te bevatten die mogelijkerwijze tot een eenduidige identificatie kan leiden. Wel bleek de achtergrond soms niet volledig te zijn ontkleurd.

Drogen.

Het electroferogram werd met de dragerfilm op een glasplaat gelegd en gedurende de nacht aan de lucht gedroogd.

Bewaren.

Het gedroogde gel werd in de originele verpakking, een soort cassette, geplaatst. Het bewaren bleek geen bijzondere moeilijkheden op te leveren.

Voordelen.

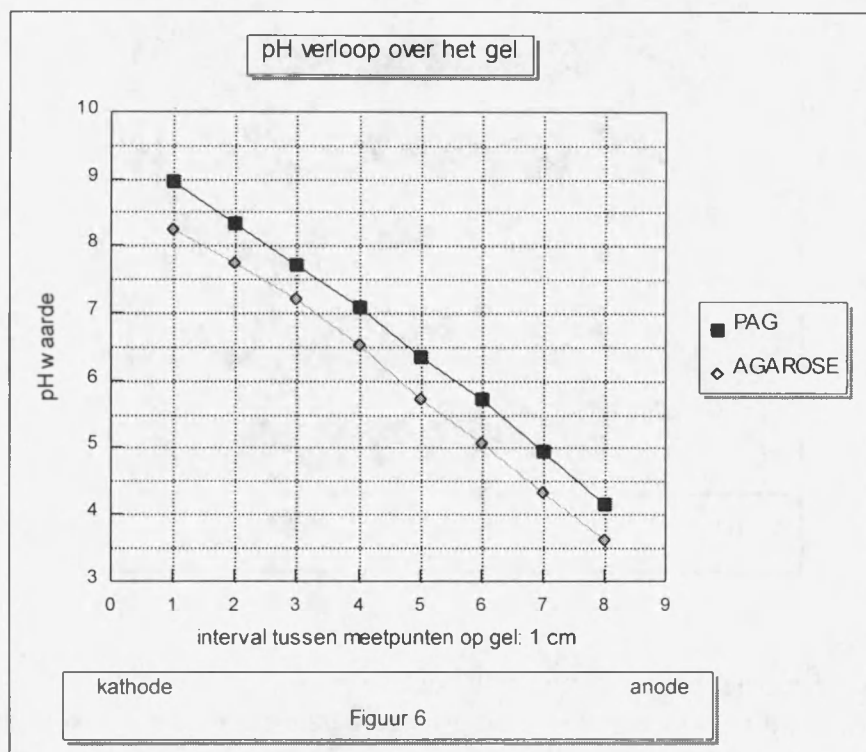
Naast de hierboven bij de PAG opgesomde voordelen kan nog gewezen worden op de volgende bijkomende eigenschappen voor de AGAROSE gels:

- vrij van toxische bestanddelen;
- zeer gemakkelijk te manipuleren;
- bestendig in de aanwezigheid van ureum;
- dunner en derhalve ietwat gevoeliger dan het PAG;
- een sneller afwerking van een experiment dankzij het vlotte verloop van het ontkleuren;
- de kennelijk probleemloos verlopende bewaring van het gedroogde electroferogram;
- de mogelijkheid om gekookt visvlees te onderzoeken zonder de toevoeging van ureum.

De resultaten.

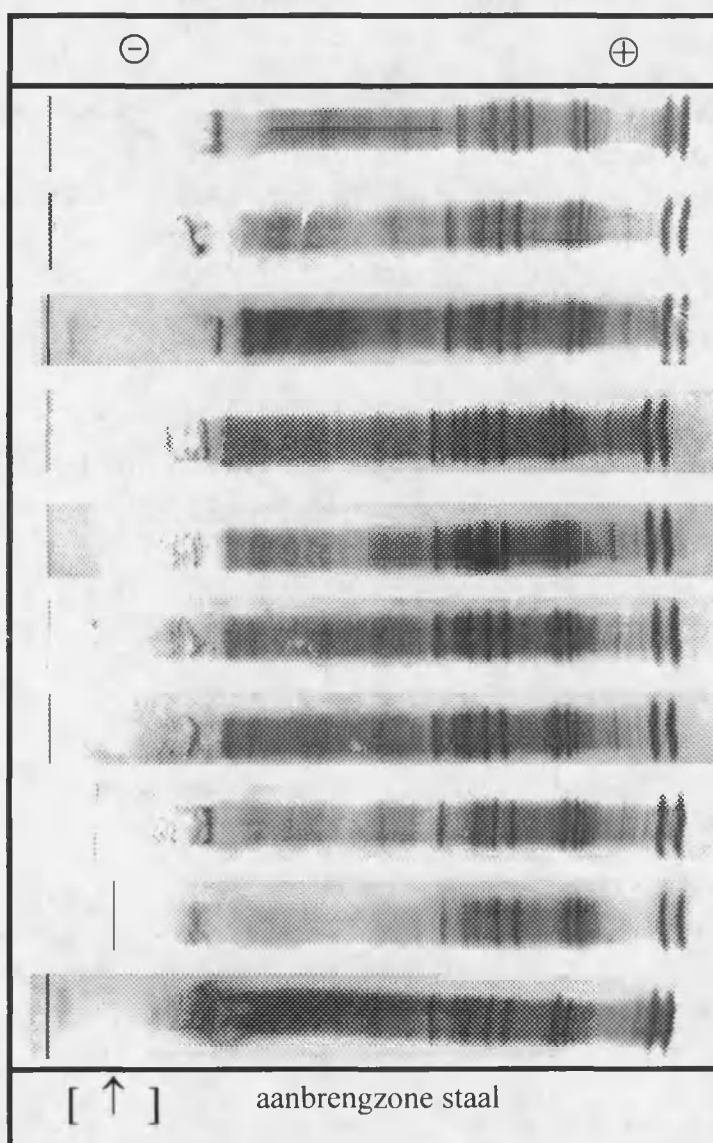
De pH-gradiënt.

Bij het evalueren van de resultaten die op PAG dan wel op AGAROSE bekomen werden vallen kleine verschillen op. Men vergelijke in dit opzicht de figuren 4 en 5. Deze zijn



voor een klein deel het gevolg van het iets bredere pH interval dat bestreken wordt met de AGAROSE gels en zijn in een belangrijke mate toe te schrijven aan de vrijwel parallelle verschuiving van de pH gradiënt tussen de beide matrixen. Gekombineerd met het pI-interval van de aanwezige proteïnes, zal dit voor gevolg hebben dat al naar gelang de omstandigheden naast een verschuiving ook een ietwat betere spreiding van de banden in één of ander electroferogram wordt gevonden. De pH-evolutie in functie van de meetplaats op het gel wordt afgebeeld in figuur 6. Hierin worden voor ieder van de beide dragers de gemiddelde waarden van 50 metingen op de aangeduide posities weergegeven.

Figuur 7. Electroforese van kabeljauw
Intra species variabiliteit.



Ofschoon een beter gespreid liggen van de electroforese banden de herkenbaarheid van het patroon in de hand werkt, zou de ietwat geringere gevoeligheid voor storingen die bij de electroferogrammen op PAG aan het licht komen, een belangrijke factor kunnen zijn bij een

gedigitaliseerde manipulatie van het patroon. Door de band genomen vertonen deze electroferogrammen een regelmatig uitzicht. De sneller optredende misvormingen in de banden op een AGAROSE gel kunnen dan weer een gevolg zijn van een grotere gevoeligheid voor de belasting.

PA-gel.

VERSE GRONDSTOF

De reproduceerbaarheid.

Tal van factoren kunnen de reproduceerbaarheid ongunstig beïnvloeden. Er kan o.m. gedacht worden aan een invloed van:

- de proefomstandigheden;
- het gel, zowel verschillen tussen de gels binnen één lot, als deze tussen de gels herkomstig uit verschillende loten spelen mee;
- een wisselende belasting, die bij een te geringe concentratie tot een verdwijnen van de zwakkere banden en bij een te hoge belasting tot het samenlopen van dicht bij elkaar liggende zware banden kan leiden en eventueel een invloed kan hebben op de vorm van de banden;
- de verschillen die binnen een species voorkomen.

Dat de reproduceerbaarheid binnen een soort toch aardig meevalt wordt door de in figuur 7 samengevatte gegevens geïllustreerd.

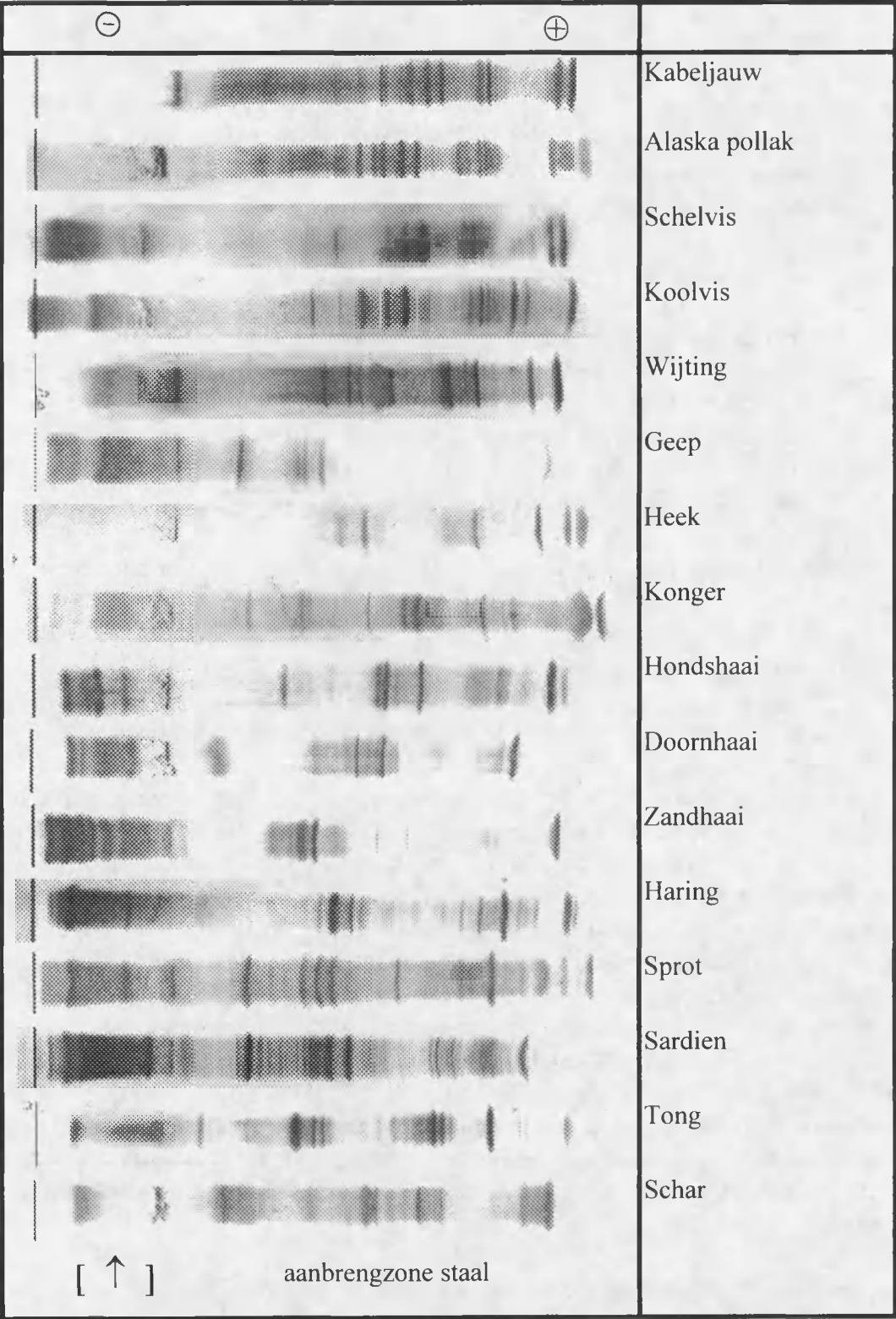
De variabiliteit tussen species.

In figuur 8 worden de verschillen tussen een aantal soorten in het licht gesteld.

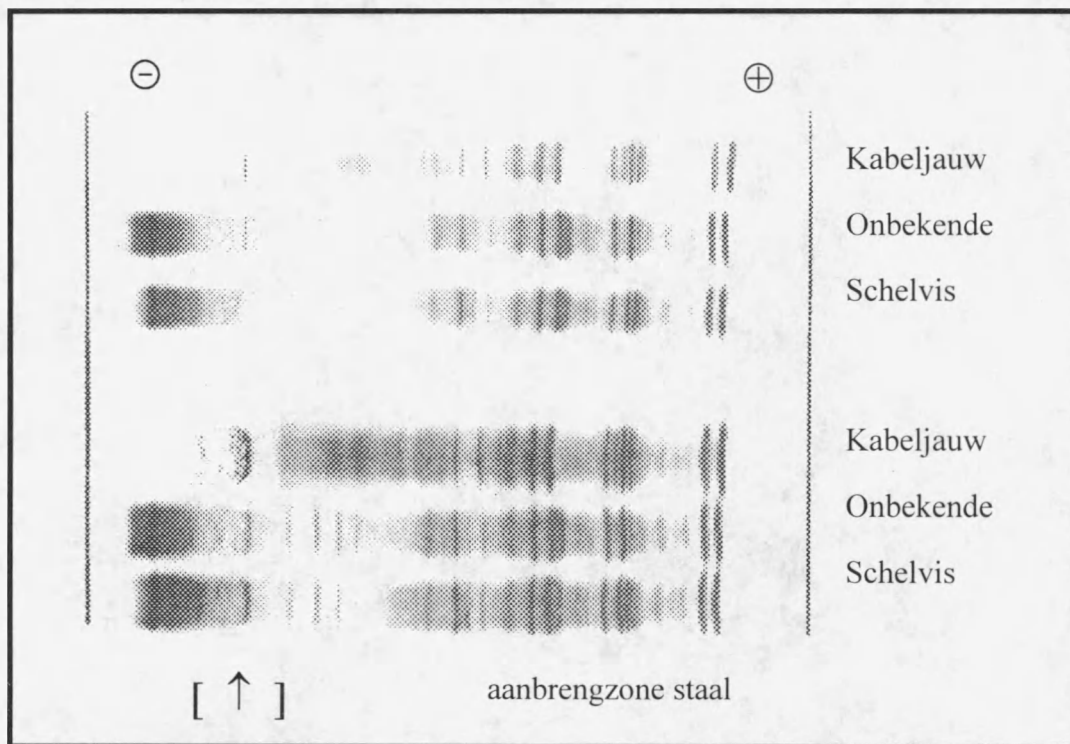
Uit een vergelijken van de figuren 7 en 8 volgt duidelijk dat deze techniek heel wat mogelijkheden biedt voor het identificeren van vers visvlees. Bij de "vissen" overtreft de variabiliteit tussen de soorten de verschillen binnen de soort. Het ligt dus door de hand dat gegevens verzameld werden om een "bibliotheek" van referentiepatronen aan te leggen, maar zo'n verzameling bevat al spoedig een onhandelbaar groot aantal "grafische gegevens". Het vergelijken van een electroferogram, de onbekende, aan al de beschikbare referenties is een tijdrovende geschiedenis. Gelukkig wordt voor een identificatie de vraag vaak geformuleerd als volgt: "Is dit deze of gene soort?", zodat een vergelijkingsexperiment het antwoord kan opleveren. Zo wordt in figuur 9 de vraag beantwoordt of de onbekende kabeljauw dan wel schelvis is. Uit de bekomen gegevens blijkt dat het electroferogram van de onbekende een zeer grote mate van overeenkomst vertoont met dit van de referentie "schelvis". In de figuren 10 en 11 worden andere voorbeelden gegeven. Deze figuren zijn belangrijk omwille van het feit dat de analyse uitgevoerd werd op een produkt dat een "zachte warmtebehandeling" had ondergaan.

Appendix 1 en 8 brengen een overzicht van de gegevens die met behulp van deze techniek bekomen werden bij het onderzoek van vers visvlees.

Figuur 8. IEF op PAG.
Variabiliteit inter species



Figuur 9. Identificatie van onbekende species.
IEF op PAG.



PAG ELECTROFEROGRAMMEN VAN THERMISCH BEHANDELD MATERIAAL.

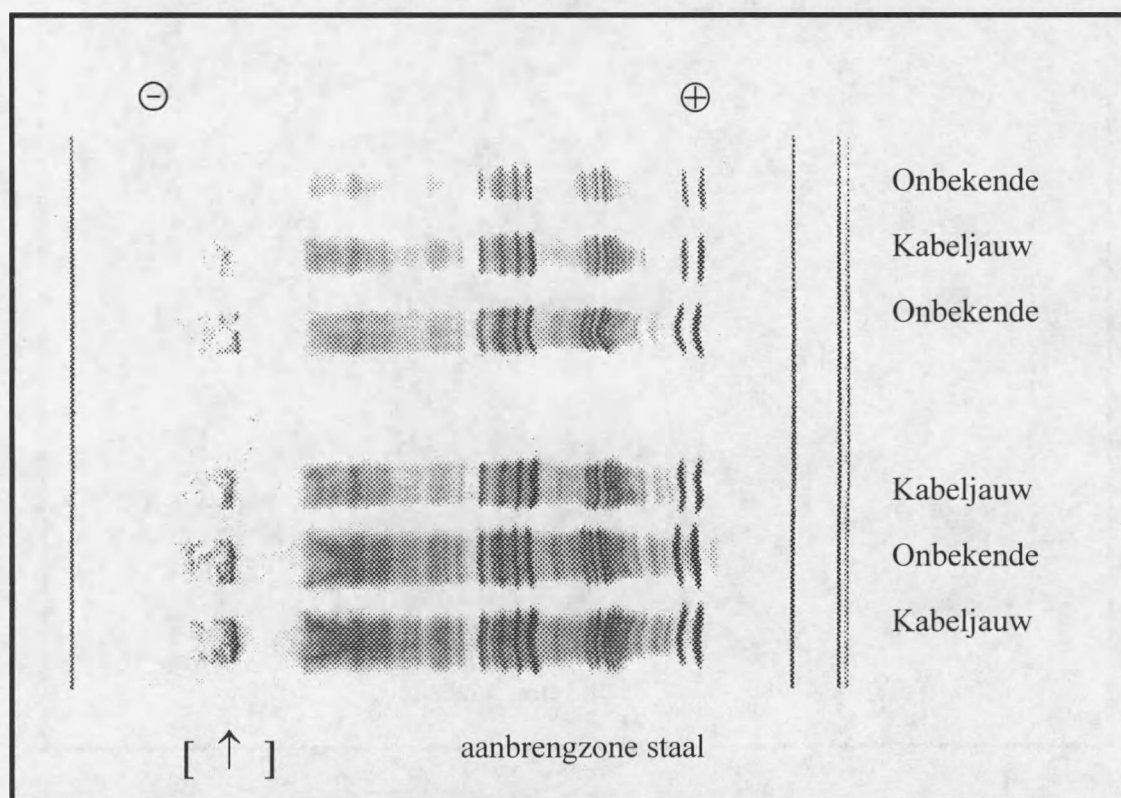
Bij het onderzoek van thermisch behandeld materiaal werd een onderscheid gemaakt tussen produkten die slechts een lichte en deze die een zware warmtebehandeling hadden ondergaan.

Zachte thermische behandeling.

Tot deze categorie werden ondermeer de koud gerookte produkten en de eventueel voorgebakken produkten zoals fishsticks en fishfingers gerekend. Bij laatst genoemde produkten was het immers mogelijk om het analysemateriaal uit de kern van het te onderzoeken materiaal te halen. Van een paar van deze sticks werd de aanklevende laag paneermeel afgekrabd, de buitenste laag werd weggesneden en de rest werd op de normale wijze bewerkt.

In het in figuur 10 weergegeven onderzoek ligt het antwoord voor de hand. De betrokken fishsticks bestaan inderdaad uit kabeljauw, in figuur 11 worden dan de resultaten weergegeven van een analyse van fishsticks waarbij de aangewende vis dan weer niet met de referentie overeenstemde. Na een thermische behandeling wordt niet altijd een goede overeenkomst gevonden met het electroferogram van het verse visvlees van de betrokken soort. Dit wordt geïllustreerd aan de hand van de analyses van gerookte stalen. De

Figuur 10. Analyse van fishsticks.
IEF op PAG.



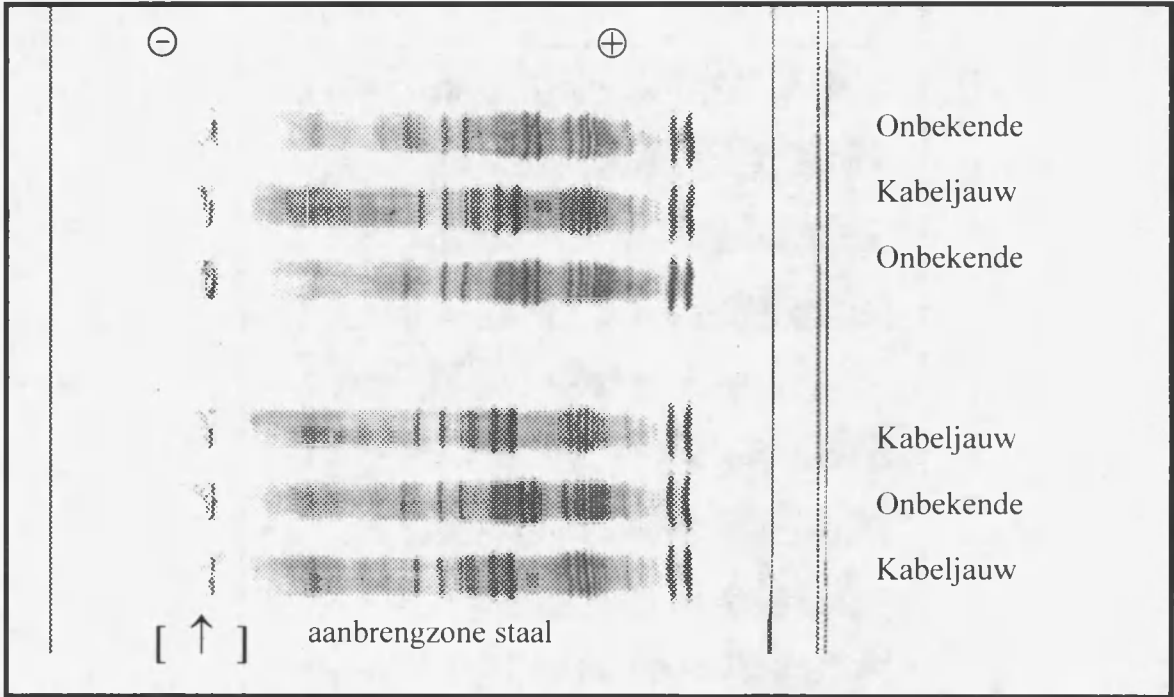
voorbereiding verliep op de beschreven wijze en de resultaten worden samen met enkele analyses op het verse visvlees weergegeven in figuur 12. De electroferogrammen van het gerookte materiaal vertonen onderling een grote mate van overeenkomst, maar trekken weinig op de electroferogrammen van het verse visvlees. Dit ligt in de lijn van de verwachtingen. Een verhoging van de temperatuur vermindert de oplosbaarheid van de eiwitten, maar, zoals bleek bij het onderzoek van gekookt visvlees, na de kleuring werden de eiwitten kennelijk ook minder goed gefixeerd op het gel. Tal van banden kwamen na het kleuren voor maar ze verdwenen gedurende het ontkleuren van de achtergrond. Een overzicht van produkten, die op deze wijze werden onderzocht, werd in appendix 2 gegeven.

Gekookt visvlees.

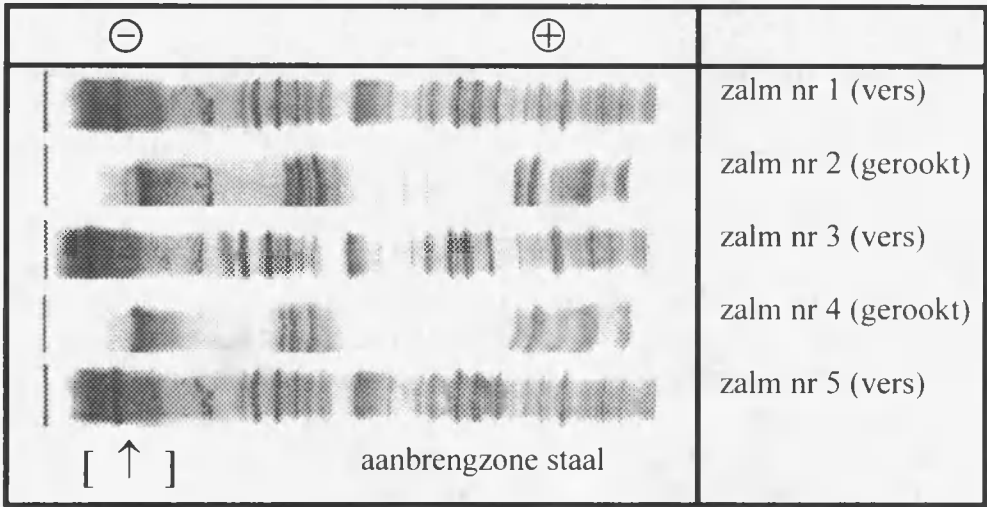
Met de voorgestelde techniek bleek het niet mogelijk om gekookt visvlees te onderzoeken.

Agarose gel.

Figuur 11. Analyse van fishsticks.
IEF op PAG.



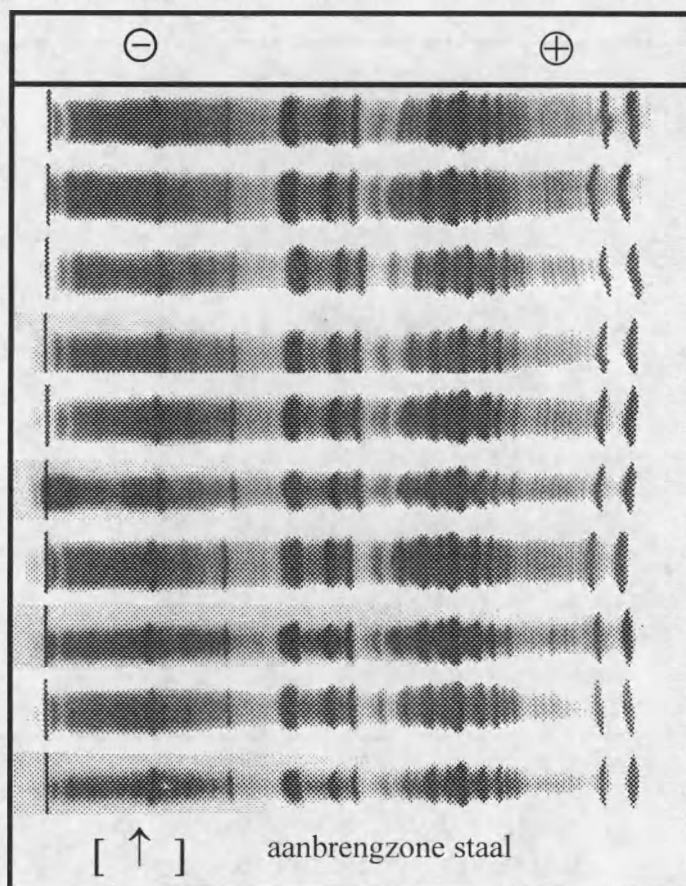
Figuur 12. Iso-electroferogrammen op
PAG van verse en gerookte zalm



VERSE GRONDSTOF.

De reproduceerbaarheid.

Figuur 13. IEF op AGAROSE.
Variabiliteit intra species (Tilapia)



In verband met het onderzoek van vers visvlees volstaat het om met behulp van enkele voorbeelden de reproduceerbaarheid binnen de species te illustreren. Dit wordt in figuur 13 gedaan met behulp van de gegevens die bekomen werden bij het Tilapia onderzoek.

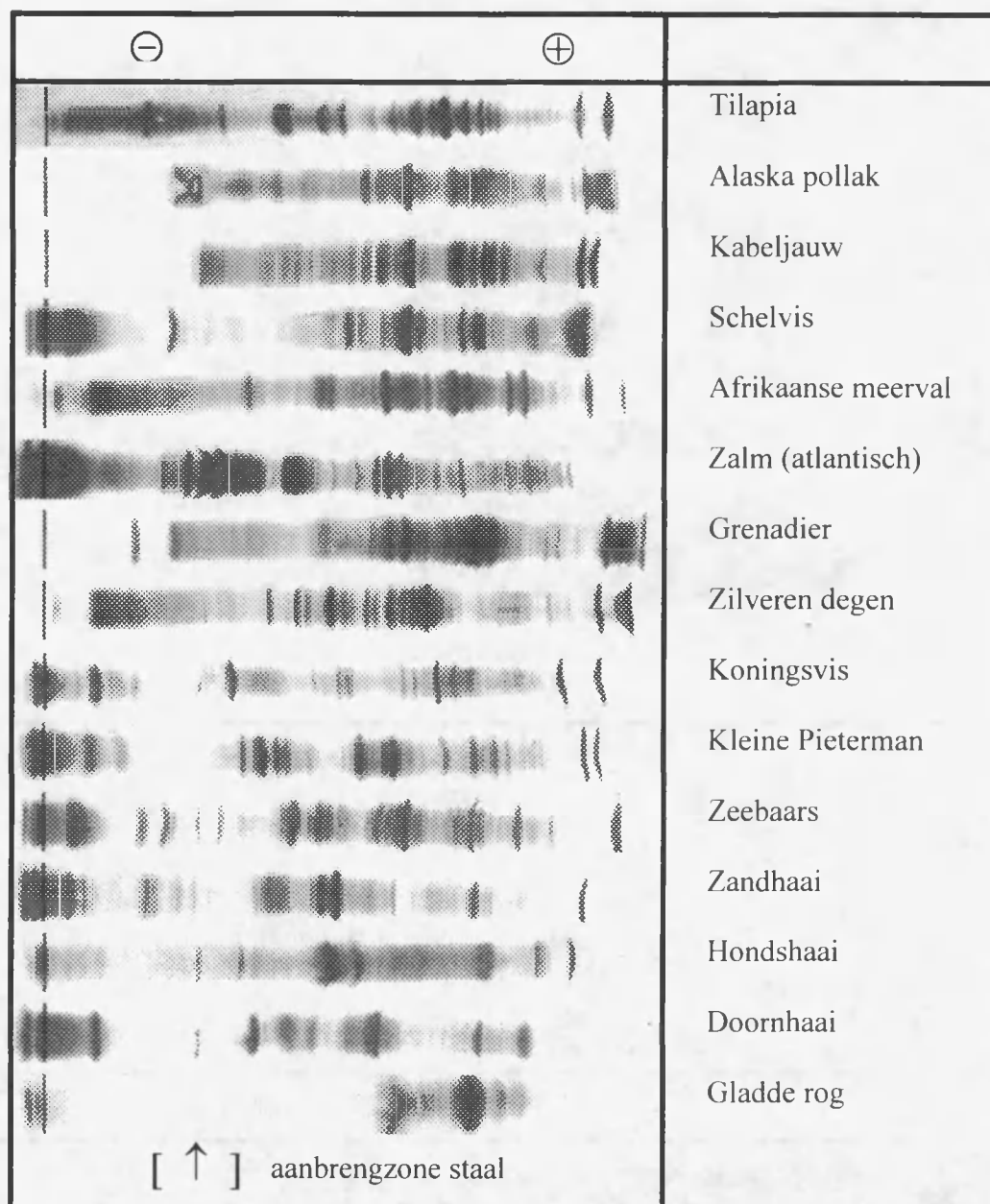
De variabiliteit tussen soorten.

Dat de variabiliteit tussen de soorten de mogelijkheid tot het identificeren van "onbekenden" inhoudt blijkt dan weer uit de gegevens die in figuur 14 vervat zijn. Een overzicht van de beschikbare gegevens wordt in appendix 3 en 8 gegeven. De bestaande verscheidenheid laat toe om met behulp van een vergelijkingsproef een antwoord te geven op de vraag of een gegeven staal tot deze of gene soort behoort. Dit wordt geïllustreerd door figuur 15. De onbekende is geen koolvis, wel kabeljauw.

THERMISCH BEHANDELD VISVLEES.

De agarosegel leent zich niet alleen voor het onderzoek van gerookte en andere produkten die een zachte thermische behandeling ondergingen, maar ook voor het onderzoek van gekookt visvlees.

Figuur 14. IEF op AGAROSE.
Variabiliteit inter species.

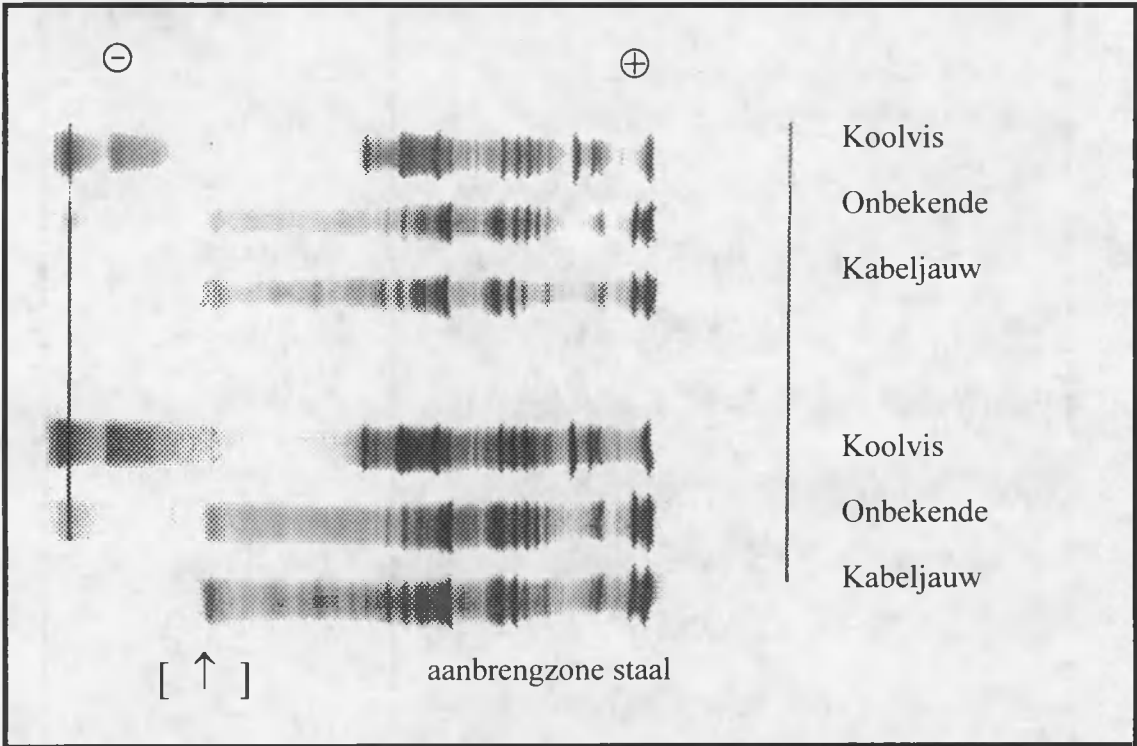


Zacht thermisch behandeld materiaal.

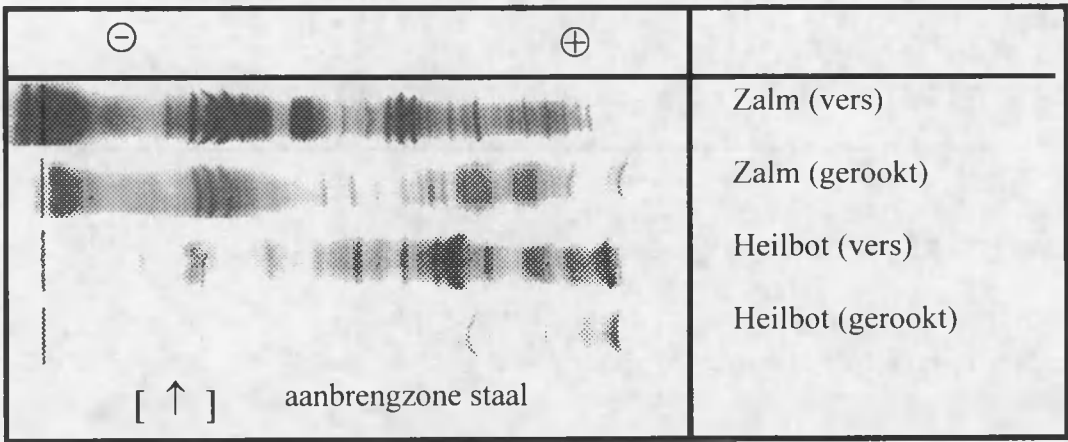
Zoals bij het onderzoek van de PA-gels bleek de toegepaste methode bruikbaar voor het bekomen van informatie over de species wanneer het produkt aan een zachte thermische behandeling onderworpen was. Enkele gegevens die dit illustreren werden in figuur 16

samengebracht. Een overzicht van het geheel van de beschikbare gegevens wordt gegeven in appendix 4, 5 en 8.

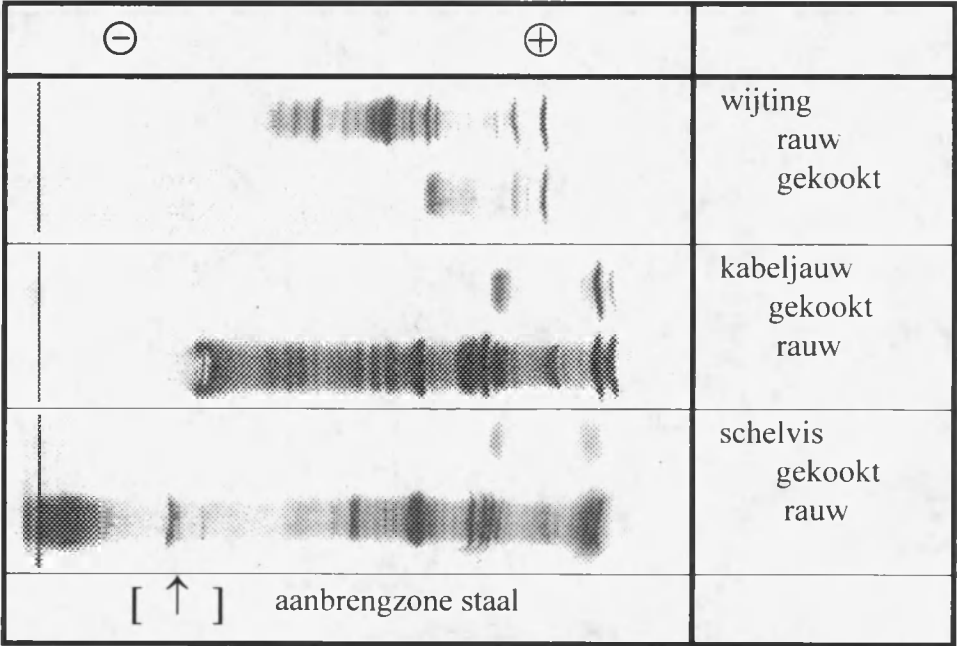
Figuur 15. Identificatie.
IEF op AGAROSE.



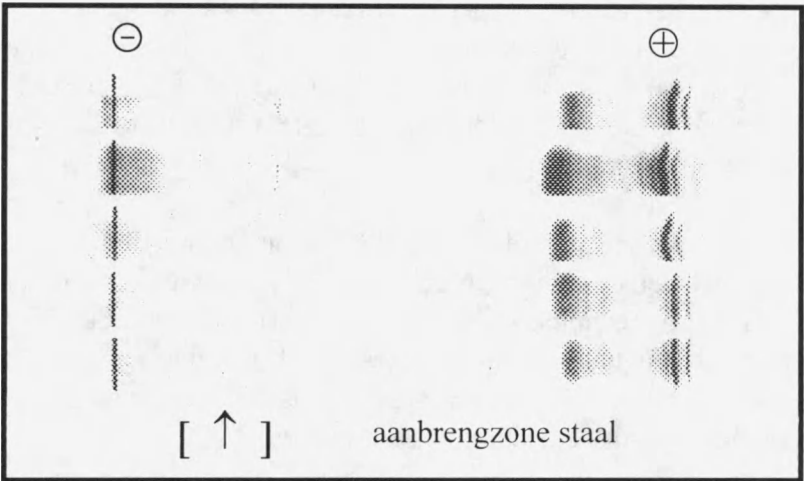
Figuur 16. Verse versus gerookte produkten.
IEF op AGAROSE.



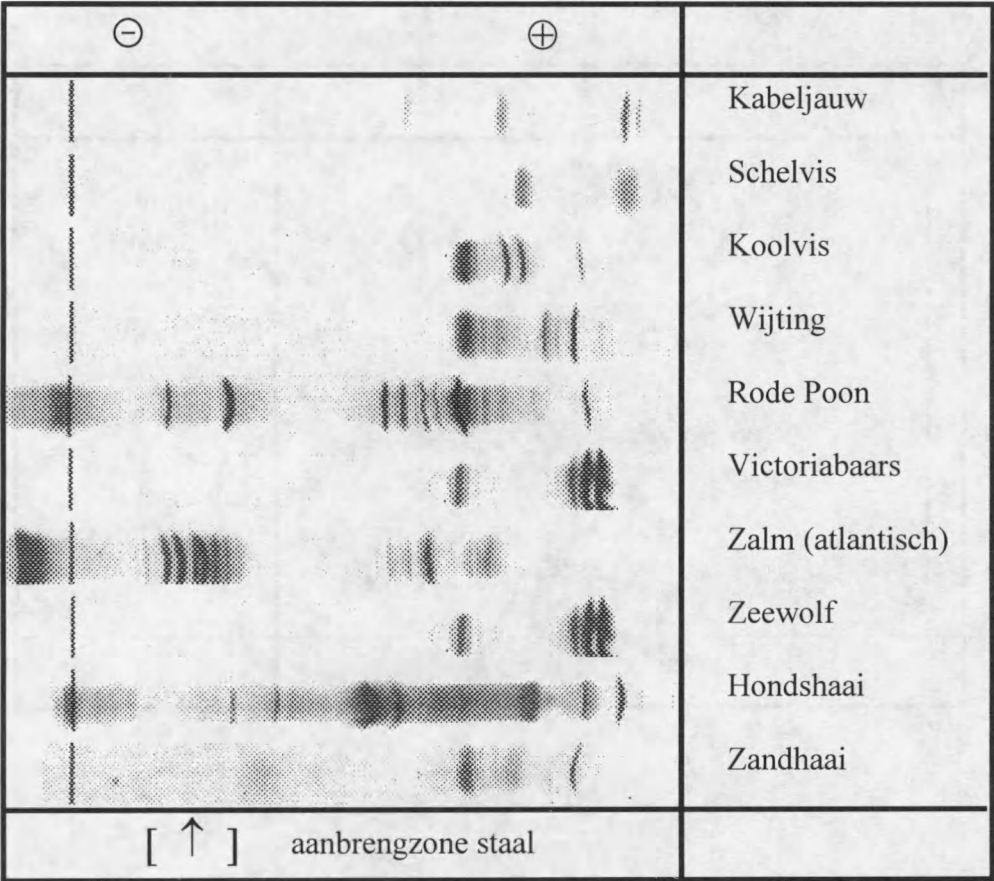
Figuur 17. Rauw versus gekookt visvlees.
IEF op AGAROSE.



Figuur 18. Gekookt visvlees (kabeljauw).
IEF op AGAROSE.
Variabiliteit intra species



Figuur 19. Gekookt visvlees
IEF OP AGAROSE.
Variabiliteit inter species.



Gekookt visvlees.

Toen bij het onderzoek van gekookt visvlees met behulp van de PAG bleek, dat na het kleuren wel banden in het electroferogram voorhanden waren, maar dat deze verdwenen gedurende het ophelderen van de achtergrond, werd het onderzoek aangevat van andere kleurtechnieken. In de eerste plaats werd hierbij gedacht aan het gebruik van een kortere ontkleuringstijd. Dit bleek met de PAG niet maar met de AGAROSE gels wel haalbaar. Het ontkleuren werd tot 30 minuten teruggebracht.

In figuur 17 worden enkele van de bekomen resultaten, samen met het electroferogram van het verse visvlees, afgebeeld. De gegevens van figuur 18 stellen de reproduceerbaarheid van de techniek in het licht. In deze figuur worden de resultaten van het onderzoek van een 5 tal kabeljauwen samengebracht. Tenslotte wordt met behulp van figuur 19 de mogelijkheden tot het herkennen van gekookt visvlees geïllustreerd. Een overzicht van de beschikbare gegevens wordt gegeven in appendix 5 en 8.

PhastSystem.

Het PhastSystem is een tweeledig apparaat. In het eerste gedeelte gaat de electroforese onder gecontroleerde omstandigheden door, in het tweede gebeurt zowel het kleuren als het ontkleuren volgens een vooraf ingesteld programma. Eenmaal het apparaat geprogrammeerd is, volstaat het te zorgen dat de nodige vloeistoffen in een voldoende hoeveelheid voorhanden zijn en dat zowel het gel als de geladen sample applicator in het toestel geplaatst zijn. Het gedeelte electroforese wordt vervolgens gesloten, er volgt een druk op de knop en de electroforese verloopt volgens plan. Na het eindsignaal wordt het electroferogram overgebracht in de ontkleuringseenheid en opnieuw zullen volgens een wel bepaald en vooraf ingesteld programma kleuring en ontkleuring uitgevoerd worden.

Reagentia en apparatuur.

- PhastSystem (LKB 18-1018-24);
- Een flatbedscanner (HP ScanJet IIcx);
- PhastGel Sample Applicator 12/0,3 (LKB 18-1614-01);
- PhastGel Sample mal (LKB 18-0097-01);
- PhastGel IEF 3-9 (LKB 17-0543-01);
- Parafilm;
- sluitbare diepvrieszakjes;
- Fixeeroplossing:
 - een 20 % oplossing van trichloorazijnzuur (MERCK 100807) in gedistilleerd water;
- Wasoplossing:
 - 30 volumes methanol (MERCK 106009) worden gemengd met 10 volumes ijsazijn (PANREAC 131008) en 60 volumes gedistilleerd water;
- Kleurbad (geconcentreerd):
 - los een PhastGel Blue R tablet (LKB 17-0518-01) op in 80 ml gedistilleerd water. Roer gedurende 5 tot 10 minuten. Voeg hieraan 120 ml methanol (MERCK 106009) toe en roer voor 2 minuten. Tenslotte wordt gefiltreerd op een plooi filter (S & S 595 1/2);
- Kleurbad (gebruiksklaar):
 - meng 10 ml van de hierboven beschreven voorraadoplossing met 90 ml wasoplossing en voeg 100 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (BDH 10091) toe.

De electroforese.

Het extract.

Het extract werd op de reeds beschreven manier bekomen. De applicator kon echter niet met verschillende hoeveelheden geladen worden, zodat van het extract verdunningen werden gemaakt. Veelal werd de volgende reeks 1/1 (extract), 1/2, 1/5 en 1/10 gebezigd. De verdunning gebeurde met behulp van gedistilleerd water.

Het laden van de applicator.

Er werd een stukje parafilm van circa 5 x 5 cm genomen en van het geschikte model werd een afdruk gemaakt. Mits de inachtneming van de nodige tussenruimtes om de

verschillende stalen te kunnen herkennen, werd in ieder van de putjes 3 µl vloeistof aangebracht, waarna de applicator met de druppeltjes in contact gebracht werd en via capillaire krachten geladen werd. In de hierna beschreven experimenten werden op de geschetste wijze van de verdunningen van het extract aanvankelijk 0,5, later 0,3 µl op het gel aangebracht.

Het laden van het gel.

Het gel werd uit de luchtdichte verpakking gehaald en op de draagplaat van de elektroforese eenheid geplaatst. In het totaal konden twee gels gelijktijdig worden behandeld. Om een goed thermisch contact met de draagplaat te realiseren werden vooraf een paar druppels water op de plaat gebracht. Het gel werd binnen de aangeduide zone geplaatst.

De applicator werd in een daartoe voorziene gleuf van een beweegbaar raam boven de gels geschoven. In alle hierna beschreven experimenten werd de applicator aan de kant van de kathode geplaatst. Na een voorgeprogrammeerde tijd waarbij de pH gradiënt werd opgebouwd, zakte dit raam, het staal werd overgebracht op het gel en na een voldoende lange duur werd door het omhoog brengen van het raam het contact verbroken.

Het elektroforeseprogramma.

Tabel 3. PhastSystem
Electroforesekondities.

Stap	Spanning	Stroomsterkte	Temperatuur	Volt-uur
1	2.000 Volt	2.5 ma	15 °C	75 Vh
2	200 Volt	2.5 ma	15 °C	15 Vh
3	2.000 Volt	2.5 ma	15 °C	410 Vh

Het voortschrijden van het proces werd in volt-uren (Vh) uitgedrukt. De eerste stap omvatte in het totaal 75 Vh, de tweede 15 Vh en de laatste fase legde beslag op 410 Vh. Gedurende de eerste fase werd de pH-gradiënt ingesteld. Behoudens de basisstappen is verder opgegeven wanneer:

- a) een alarmsignaal de operator diende te waarschuwen omde applicator in het apparaat te plaatsen. In al de hierboven beschreven experimenten werd het proces evenwel niet onderbroken vermits de applicator in het raam geschoven werd vooraleer de elektroforese opgestart werd. Dit signaal vestigde de aandacht van de operator op het begin van de scheiding. Het programma zorgde in stap 1 voor een bijkomend alarmsignaal na 73 Vh;
- b) het raam met de applicator diende te zakken bij de aanvang van stap 2, hetzij na een elektroforeseduur van 75 Vh;

- c) het raam met de applicator diende omhoog gebracht te worden bij de aanvang van stap 3. Tijdens het "electroforeseinterval" van 15 Vh werd de vloeistof van de applicator op het gel overgebracht.

De operator werd verwittigd van het einde van de electroforese door een alarmsignaal. Het deksel van de electroforeseruimte kon geopend worden en het gel kon overgebracht worden naar de ontwikkelingseenheid.

Het ontwikkelen.

Na het sluiten van de ontwikkelingseenheid volstond een druk op de knop om de ontwikkelingsprocedure op gang te brengen. Hierbij werden de nodige vloeistoffen aangezogen en afgevoerd via een bepaalde in- en uitgang. De tijdsduur en de temperatuur waarbij de betrokken fase doorging werd eveneens aangegeven. Het gevolgde schema werd in tabel 4 samengevat.

Tabel 4. PhastSystem.
Het (ont)kleuren.

Stap	Operatie	Poort (IN)	Poort (UIT)	Duur (min)	Temp. (°C)
1	Fixeren	1	1	5,0	20,0
2	Wassen	2	2	2,0	20,0
3	Kleuren	3	0	10,0	50,0
4	Ontkleuren	4	0	5,0	50,0
5	Ontkleuren	5	0	5,0	50,0

De 0 waarde in de rubriek "poort (uit)" betekent dat de vloeistof na gebruik niet gerecupereerd wordt. Het kan enigszins verbazing wekken dat er twee ontkleuringen en niet een enkele, gekombineerde stap gebezigd werd. In realiteit bleek de normaal in te sluiten behandelingsstap met een bewaaroplossing op basis van glycerine niet nodig en anderzijds bleek het ontkleuren van de achtergrond moeizamer te verlopen dan eigenlijk verwacht werd. Beide aspecten werden als het ware gekombineerd door de laatste standaardbehandeling te vervangen door een bijkomende ontkleuring. Op te merken valt nog dat geen gebruik werd gemaakt van de mogelijkheden tot compensatie voor sterk afwijkende vloeistoftemperaturen.

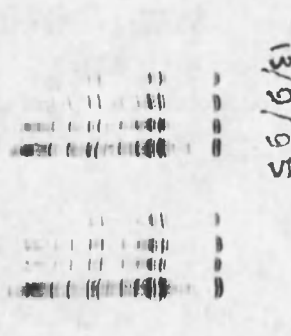
Drogen.

Het einde van de ontwikkelingsfase werd door een alarmsignaal aangekondigd en het gel kon uit de eenheid genomen worden. In alle hier beschreven experimenten werd het gel op een glasplaat gelegd met de gelzijde naar boven en over het gel werd een petrischaal geplaatst. Hieronder droogde het gel probleemloos bij kamertemperatuur.

Bewaren.

Het gedroogde gel werd in een diepvrieszakje geplaatst. Tot nu toe blijkt het bewaren van het originele materiaal geen problemen op te leveren.

Figuur 20
Victoriabaars PhastSystem



Documentatie.

De weergave van de afbeeldingen die met behulp van de Chinon apparatuur werden opgenomen bleek weinig voldoening te geven. De bekomen gels konden behoorlijk gedigitaliseerd worden met een HP ScanJet IIcx. Een eventuele bewerking van het ingelezen beeld gebeurde met het programma Aldus Photostyler.

De resultaten.

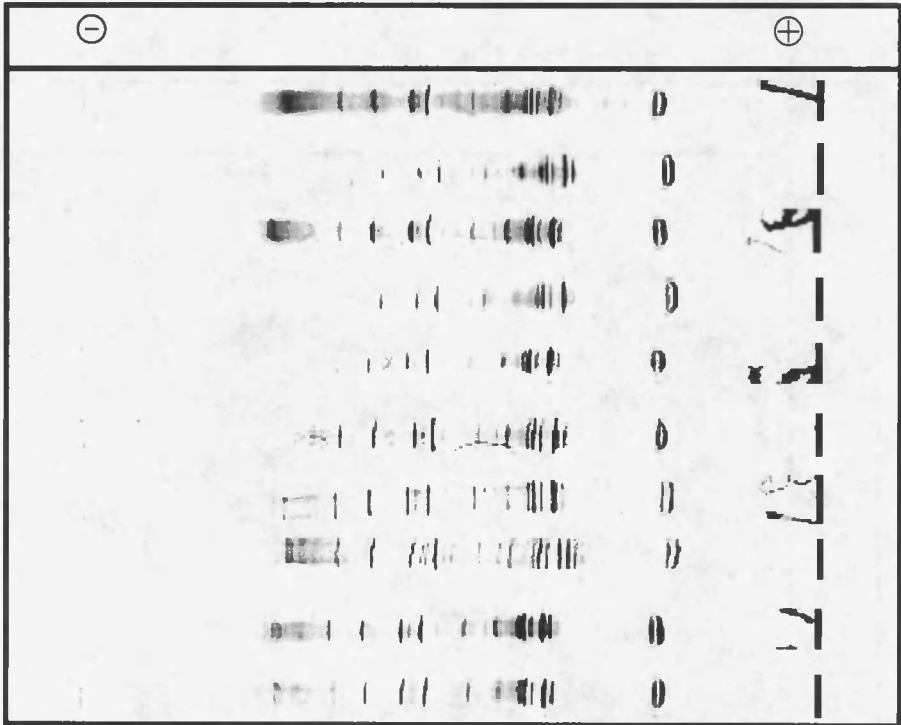
De afmetingen van het gel.

Reeds bij de voorafgaande bespreking werd gewag gemaakt van de geringe afmetingen van het gel. In figuur 20 wordt een dergelijk gel op werkelijke grootte afgebeeld.

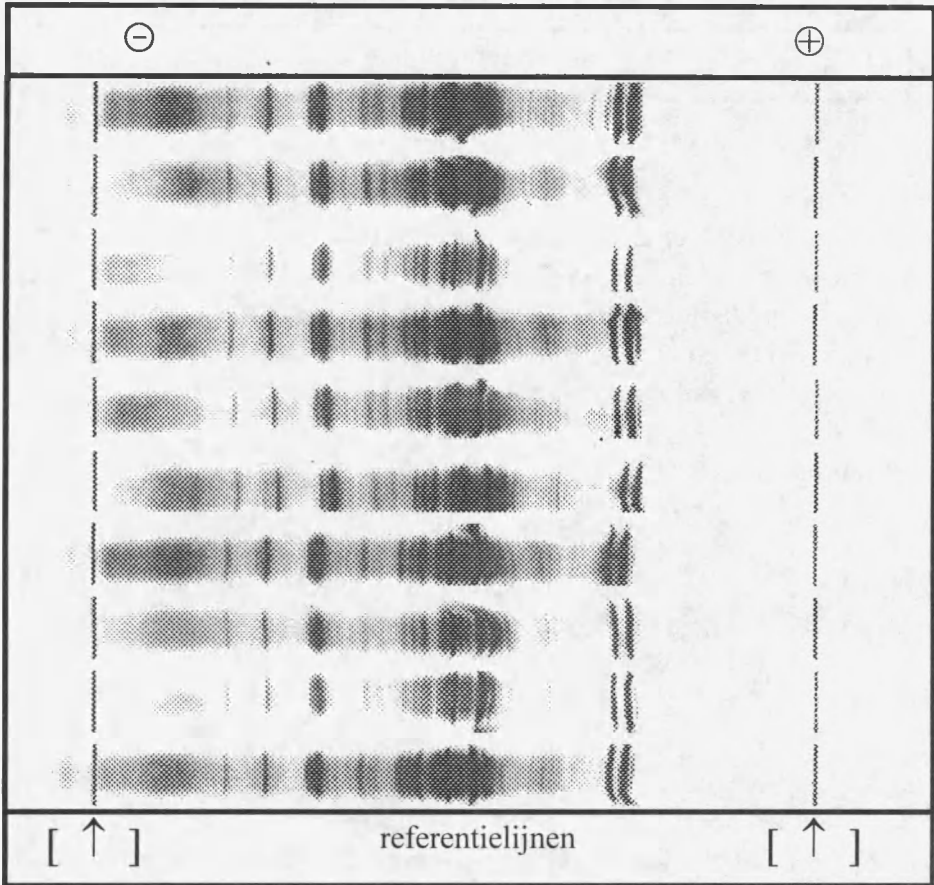
Teneinde bij de verdere behandeling de eventuele overeenkomsten en verschillen duidelijker aan het licht te brengen werden de figuren 2 x vergroot afgebeeld. De geringe afmetingen hebben zowel voor- als nadelen. Tot de voordelen kunnen gerekend worden de snelheid waarmee de operatie verloopt. De elektroforese, de kleuring en de ontkleuring samen nemen niet eens anderhalf uur in beslag. Verder is er de verregaande standaardisatie van de techniek, waardoor de kans op menselijke fouten in grote mate verlaagd wordt. Daartegenover staan dan wel de grotere relatieve fouten bij het vastleggen van bijvoorbeeld de posities van de banden.

De variabiliteit binnen de soort.

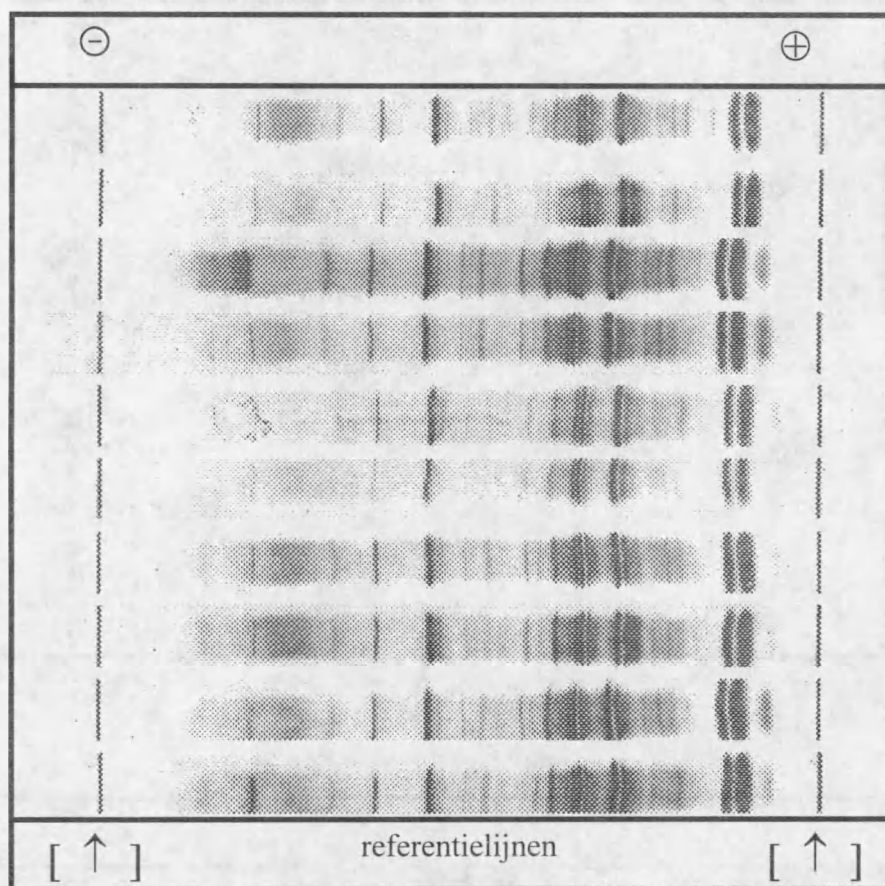
Figuur 21. Variabiliteit intra species
Victoriabaars PhastSystem



Figuur 22. Variabiliteit intra species
Victoriabaars op AGAROSE



Figuur 23. Variabiliteit intra species
Victoriabaars PAG



De resultaten bekomen bij de analyse van 10 individuen van de Victoriabaars worden in figuur 21 weergegeven. Het is duidelijk dat de reproduceerbaarheid behoorlijk lager uitvalt dan met de klassieke IEF techniek op PAG of op AGAROSE, waarvan de gegevens in de figuren 22 en 23 opgenomen zijn. Een goede identificatie aan de hand van de electroferogrammen bekomen met het PhastSystem zal vermoedelijk slechts mogelijk zijn bij een vergelijkend experiment of door een bijkomende beeldbehandeling in te schakelen.

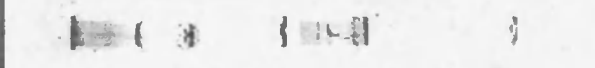
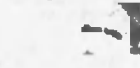
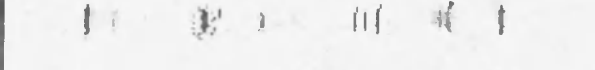



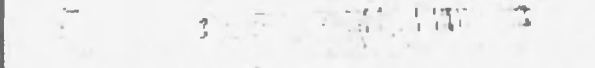


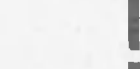
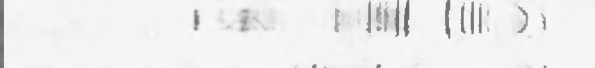

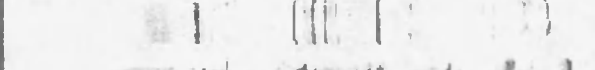



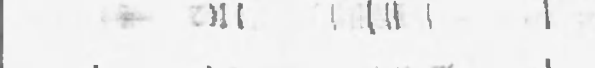



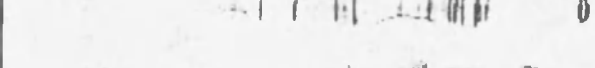
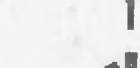
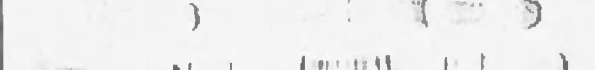





De variabiliteit intra species.

De slechtere reproduceerbaarheid van het PhastSystem betekent echter niet dat er tussen de verschillende soorten geen verschillen in de electroferogrammen zouden gevonden worden. Gegevens die dit illustreren zijn opgenomen in figuur 24.

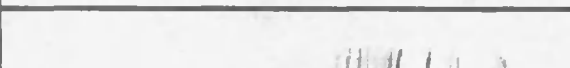

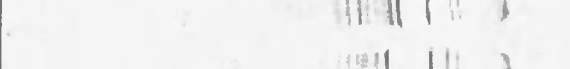





De bruikbaarheid.

Ondanks de geringere reproduceerbaarheid overtreffen de verschillen tussen de soorten deze binnen een soort, zodat de methode bruikbaar is voor identificaties waarin een referentiestaal kan meelopen. Dit wordt geïllustreerd door de gegevens die in figuur 25 zijn

Figuur 24. Variabiliteit intra species
PhastSystem

⊖	⊕	Soort
		Doornhaai
		Doornrog
		Gladde rog
		Heilbot
		Hondshaai
		Kabeljauw
		Kleine Pieterman
		Koningsvis
		Pitvis
		Stekelrog
		Victoriabaars
		Vierdradige meun
		Zeebaars
		Zandhaai

Figuur 25. Mogelijkheden PhastSystem

⊖	⊕	
		Identificatie onbekende
		kabeljauw (ref)
		zalm (atlantisch) vers
		zalm (atlantisch) gerookt

opgenomen. Het onderzochte staal werd vergeleken aan kabeljauw en er zijn duidelijke verschillen waar te nemen. Zoals bij de klassieke IEF techniek op PAG kan informatie bekomen worden over gerookte vis, met andere woorden over produkten die een bewerking bij een relatief lage temperatuur ondergaan hadden. Dit blijkt uit de gegevens in figuur 25. Overigens is het duidelijk dat het electroferogram van gerookte zalm weinig overeenkomst vertoont met dat van de verse vis. Een overzicht van de beschikbare gegevens in verband met het PhastSystem vindt men in appendix 6, 7 en 8.

Algemeen besluit.

Het staat buiten kijf dat de klassieke techniek met PA-gels de best reproduceerbare resultaten oplevert. Het gebruik van het PhastSystem lijkt slechts overwogen te kunnen worden bij het onderzoek van een beperkte scala aan soorten en wanneer het snel bekomen van resultaten erg belangrijk is. Uit de bekomen gegevens kan afgeleid worden dat het mogelijk moet zijn een bestand op te bouwen waarin met behulp van aangepaste software de overeenkomsten met een onbekende kunnen opgezocht worden. Het is op grond van de beschikbare ervaring niet duidelijk of hierbij een continu groeiend bestand moet gebezigd worden waarin voortdurend meer electroferogrammen van iedere soort worden opgeslagen, dan wel of gebruik dient gemaakt van basiskenmerken af te leiden uit een kleiner aantal analyses per soort. De tweede methode is de minst eenvoudige, maar op langere termijn vermoedelijk de meest renderende.

De PAG techniek blijkt ook bruikbaar voor het onderzoek van visvlees dat een zachte thermische behandeling had ondergaan, maar faalde bij de analyse van gekookt materiaal. Tussen de electroferogrammen van vers en deze van thermisch behandeld materiaal bestaat er soms enige overeenkomst, maar dat is geen regel.

Het bewaren van de ferogrammen levert wel enige moeilijkheden op. Dit is veel minder het geval bij het drogen en bewaren van de AGAROSE gels. Deze laatste leenden zich ook voor het onderzoek van gekookt materiaal. Of de analyse een eenduidig identificeren van het gekookt visvlees toelaat vereist verder onderzoek.

Op te merken valt dat het voorkomen van een soort in een van de appendixen nog niet betekent dat kwalitatief hoogstaande electroferogrammen bekomen werden. Dit is over het algemeen wel zo bij het onderzoek van been- en kraakbeenvissen, maar is in veel mindere mate het geval bij de analyse van zeezoogdieren en schaal- en schelpdieren.

Literatuur.

- Baars D. C. H., Ruiter A. - Voorlopig intern verslag over de identificatie van vissoorten door electroforese van hun sarcoplasmische eiwitten. Instituut voor Visserijprodukten TNO, Rapport Nr R. 264.
- Coduri R. J., K. Bonatti, K. L. Simpson - Application of Vertical Plate Gel electrophoresis to the Separation of Pigmented and Non-Pigmented Trout and Salmon species. J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1979)62(2)269.
- Freeman C., C. -Detection and Differentiation of Cod Meat Substituted for Crabmeat in Frozen Crab Products. J. Assoc. Off. Anal. Chem.(1968)51(3)509.

- Fürling D., C. Gersonde - Erfahrungen mit der Isoelectrischen Fokussierung bei der Tierartenbestimmung. Lebensmittelchemie u. gerichtl. Chemie (1980)34,135.
- Hamilton W. D. - Fish Species Identification by Thin Layer Agarose isoelectric Focusing and Densitometric Scanning. J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1982)65(1)119.
- Learson R. J. - Collaborative Study of a Rapid Electrophoretic Method For Fish Species Identification. J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1969)52(4)703.
- Learson R. J. - Collaborative Study of a Rapid Electrophoretic Method For Fish Species Identification. II. Authentic Flesh Standards. J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1970)53(1)7.
- Lundstrom R. C. - Fish Species Identification by thin Layer Isoelectric Focusing. J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1979)62(3)624.
- Lundstrom R. C. - Fish Species Identification by Isoelectric Focusing: Sarcoplasmic Protein Polymorphism in Monkfish (*Lophius americanus*). J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1981)64(1)32.
- Lundstrom R. C. - Rapid Fish Species Identification by Agarose Gel Isoelectric Focussing of Sarcoplasmic Proteins. J. Assoc. Off. Anal. chem. (1981)64(1)38.
- Lundstrom R. C. - Identification of Pacific Rockfish (*Sebastes*) Species by Isoelectric Focusing. J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1983)66(4)974.
- Lundstrom R. C., M. C. Annand, C. R. Barmore, S. A. Braddon, B. Caffrey, J. Krzynowek, W. Laird, A. F. LaTerza, T. Lin, B. W. Little, I. M. Mackie, I. M. Moodie, R. Morrison, P. H. Odense, G. P. O'Leary, S. Stiles, B. E. Tuhkunen, K. Wiggin - Fish Species Identification by Agarose Gel Isoelectric Focussing: Collaborative Study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1983)66(1)123.
- Lundstrom R. C., C. R. Barmore, J. Krzynowek, A. F. LaTerza, B. W. Little, G. P. O'Leary, R. A. Robohom, K. Wiggin - Fish Species Identification by Thin Layer Polyacrylamide Gel Isoelectric Focussing: Collaborative Study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1980)63(1)69.
- Newton R. - Identification of Canned Salmon Species by Scale Characteristics. J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1979)62(4)722.
- Thompson R. R. - Disk Electrophoresis Method for the Identification of Fish Species. J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1967)50(2)282.

Oostende, april 1996.

***Appendix 1. In verse of diepbevroren toestand met IEF op PAG
onderzochte soorten.***

Afrikaanse Meerval		Sardien	
Alaska Pollak		Schar	
Ansjovis		Schelvis	
Bot		Schol	
Doornhaai		Slakdolf	
Doornrog	(dialyse)	Smelt	
Dorade		Sprot	
Driedoornige Stekelbaars		Staatvis	
Dwergtong		Steenbolk	
Geep		Stekelrog	(dialyse)
Gladde Rog	(dialyse)	Tarbot	
Grauwe Poon		Tilapia	
Grenadier		Tong	
Griet		Tongschar	
Harder		Victoriabaars	
Haring		Vierdradige Meun	
Harnasmannetje		Vijfdradige Meun	
Heek		Wijting	
Heek	(Argentinië)	Zalm	(atlantisch)
Heilbot		Zalm	(Chili)
Hondshaai	(dialyse)	Zalm	(Noors)
Horsmakreel		Zalm	(pacifiek)
Kabeljauw		Zalm	(Schots)
Kleine Pieterman		Zalmforel	(zeewater)
Konger		Zalmforel	(zoetwater)
Koningsvis		Zalmforel	(hybride 20)
Koolvis		Zalmforel	(hybride 27)
Leng		Zandhaai	
Makreel		Zandspiering	
Pieterman		Zeebaars	
Pitvis		Zeedonderpad	
Rivierprik		Zeeforel	
Rode Poon		Zeewolf	
Roodbaars		Zilveren Degen	

Appendix 2. Visproducten waarvan het vlees een zachte thermische behandeling onderging en die met behulp van IEF op PAG werden onderzocht.

Zalm (Noors)	gerookt
Zalm (Atlantisch)	gerookt
Zalmforel	gerookt
Fishfinger	voorgebakken
Heilbot	gerookt
Forel	gerookt
Visbrochette	voorgebakken

Appendix 3. In verse of diepgevroren toestand met IEF op AGAROSE onderzochte soorten.

Afrikaanse Meerval	Smelt
Alaska Pollak (dialyse)	Stekelrog
Doornhaai	Tilapia
Doornrog (dialyse)	Victoriabaars
Driedoornige Stekelbaars	Vijfdradige Meun
Dwergtong	Vierdradige Meun
Gladde Rog (dialyse)	Wijting
Grenadier	Zalm (Atlantisch)
Heek	Zalm (Chili)
Heek (Argentinië)	Zalm (Noors)
Heilbot	Zalm (Pacifiek)
Hondshaai (dialyse)	Zalm (Schots)
Kabeljauw	Zalmforel (zeewater)
Kleine Pieterman	Zalmforel (zoetwater)
Koningsvis	Zalmforel (hybride 20)
Koolvis	Zalmforel (hybride 27)
Pitvis	Zandhaai
Rivierprik	Zeebaars
Rode Poon	Zeedonderpad
Schelvis	Zeewolf

***Appendix 4. Met IEF op AGAROSE onderzochte visproducten.
(Na een zachte thermische behandeling)***

Forel	(gerookt)
Heilbot	(gerookt)
Zalm (atlantisch)	(gerookt)
Zalmforel	(gerookt)

***Appendix 5. Soorten waarvan het visvlees na koken onderzocht werd met
IEF op AGAROSE.***

Hondshaai
Kabeljauw
Koolvis
Rode Poon
Schelvis
Victoria Baars
Wijting
Zalm
Zandhaai

***Appendix 6. In verse of diepbevroren toestand met het PhastSystem
onderzochte soorten.***

Doornhaai	
Doornrog	(dialyse)
Gladde rog	(dialyse)
Heilbot	
Hondshaai	
Kleine Pieterman	
Koningsvis	
Pitvis	
Stekelrog	(dialyse)
Vierdradige meun	
Zalm	(atlantisch)
Zalm	(pacifiek)
Zalmforel	(hybride)
Zalmforel	(zeewater)
Zalmforel	(zoetwater)
Zandhaai	
Zeebaars	

***Appendix 7. Met het PhastSystem onderzochte visproducten.
(Na een zachte thermische behandeling)***

Fishsticks	voorgebakken
Forel	gerookt
Heilbot	gerookt
Zalm (atlantisch)	gerookt
Zalmforel	gerookt

Appendix 8. Andere onderzochte zeedieren.

Soort	Wat	PAG	AGAROSE	PhastSystem
Garnaal	vers	+	+	
Noorse kreeft	vers	+		
Scampi	vers	+		
St. Jacobsschelp	vers	+		
id. gonade	vers	+		
id. spier	vers	+		
Wulk	vers	+		
Namaakkrab	vers	+	+	+
Inktvis	vers	+	+	+
Inktvis	gekookt		+	
Zeehond lever	vers	+		
Bruinvis lever	vers	+		
id. spier	vers	+		
id. huid	vers	+		
Potvis spier	vers	+		
id. huid	vers	+		
Grote Zeenaald	vers	+		

